UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE

ANNÉE 1955 N° 248

ÉTUDE DE DEUX COLORANTS DU SYSTÈME HISTIOCYTAIRE LE BLEU TRYPAN ET LE BLEU MONOSOL

Travail effectué aux Laboratoires d'Histologie (Professeur G MAYER) et de Chimie biologique et médicale (Professeur F. TAYEAU) de la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Bordeaux et au Centre de Recherches de Biologie Préventive de la S. S.

THÈSE POUR LE DOCTORAT EN MÉDECINE

présentée et soutenue publiquement le Mardi 20 Décembre 1955

par

Georges-Marie-Paul ROLLET

Élève du Service de Santé de la Marine et des Troupes Coloniales
Préparateur d'Histologie
Certifié d'Études spéciales de Sérologie
Diplômé de Médecine Tropicale
Né à Grenoble (Isère) le 10 Août 1927

Examinateurs de la Thèse	MM. MAYER, Professeur	Président
	TAYEAU, Professeur	
	PAUTRIZEL, Professeur	Juges
	STOLL, chargé des fonctions de Maître de de conférences agrégé.	

BORDEAUX
IMPRIMERIE R. LAPLANTE
35-37, Rue Borda

1955

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547309_0019

UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE

ANNÉE 1955 N° 248

ÉTUDE DE DEUX COLORANTS DU SYSTÈME HISTIOCYTAIRE LE BLEU TRYPAN ET LE BLEU MONOSOL

Travail effectué aux Laboratoires d'Histologie (Professeur G MAYER) et de Chimie biologique et médicale (Professeur F. TAYEAU) de la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Bordeaux et au Centre de Recherches de Biologie Préventive de la S. S.

THÈSE POUR LE DOCTORAT EN MÉDECINE

présentée et soutenue publiquement le Mardi 20 Décembre 1955

par

Georges-Marie-Paul ROLLET

Élève du Service de Santé de la Marine et des Troupes Coloniales
Préparateur d'Histologie
Certifié d'Études spéciales de Sérologie
Diplômé de Médecine Tropicale
Né à Grenoble (Isère) le 10 Août 1927

Examinateurs de la Thèse — MM. MAYER, Professeur — Président
TAYEAU, Professeur
PAUTRIZEL, Professeur
STOLL, chargé des fonctions de Maître de de conférences agrégé. — Juges

BORDEAUX
IMPRIMERIE R. LAPLANTE
35-37, Rue Borda

1955

FACULTÉ de MÉDECINE et de PHARMACIE de BORDEAUX

DOYENS HONORAIRES : MM. DUPÉRIÉ, CHELLE, G. PORTMANN.
DOYEN : M. SIGALAS. — **ASSESSEUR** : M. TAYEAU.

PROFESSEURS HONORAIRES :

MM. A. MANDOUL, ANDERODIAS, ROCHER, LANDE, DUVERGEY, CARLES, LEURET, PERY, CHARRIER, DUBREUIL, CRUCHET, PERRENS.

PROFESSEURS :

	MM.
Clinique médicale	N...
	BROUSTET
Clinique chirurgicale	PAPIN
	MASSE
Clinique d'accouchements	RIVIERE
Clinique gynécologique	MAGENDIE
Anat. patholog. et microsc. clin.	DE GRAILLY
Anatomie	DUFOUR
Anatomie générale et histologie.	MAYER
Hygiène et Cl. de la tuberculose	PIECHAUD
Méd. légale et méd. du travail.	DERVILLEE
Electroradiologie et clinique d'électricité médicale.	REBOUL
Chimie	MESNARD
Matière médicale	GOLSE
Pharmacie	VITTE
Physiologie	FABRE
Clin. méd. des mal. des enfants	FONTAN
Zoologie et parasitologie	SIGALAS

	MM
Pathologie générale et expérim.	SARIC
Clinique ophtalmologique	N...
Clin. chir. infantile et orthopéd.	POUYANNE
Clin. méd. et des mal. infect..	AUBERTIN
Chimie biologique et médicale.	TAYEAU
Physique médicale et pharmac.	PIFFAULT
Médecine coloniale et Clinique des maladies exotiques	BONNIN
Clinique des maladies cutanées et syphilitiques	JOULIA
Clin. des malad. des voies urin.	DARGET
Clin. des mal. nerv. et mentales	DELMAS-MARSALET
Clin. d'oto-rhino-laryngologie	PORTMANN
Toxicologie et hygiène appliquée	CASTAGNOU
Clinique odonto-stomatologique.	DUBECQ
Botanique et cryptogamie	GIRARD
Thérapeutique	F.-J. TRAISSAC
Hydrol. thérapeut. et climatol.	DUBARRY

PROFESSEUR A TITRE PERSONNEL :

M. BLANQUET (Section Pharmacie).

PROFESSEURS SANS CHAIRE :

MM. MAHON (Obstétrique), PAUTRIZEL (Parasitologie),
Mlle ROUGIER (Physiologie), M. MOUSTARDIER (Bactériologie).

MAITRES DE CONFERENCES AGREGES

	MM.
Anatomie pathologique	LEGER
Anatomie	RIGAUD
	CABANIE
Biochimie médicale	NEUZIL
Pathologie expérimentale	FAURE
Physique médicale	D. HAMEL

	MM.
Pharmacie (1re Section)	R. GOLSE
	ROMAIN
Pharmacie (2e Section)	MASQUELIER
	QUILICHINI
Pharmacie (3e Section)	CAZAUX

CHARGE DES FONCTIONS DE MAITRE DE CONFERENCES AGREGE :

M. STOLL (Histologie).

AGREGES EN EXERCICE :

	MM.
Médecine générale	BERGOUIGNAN
	LENG-LEVY
	MORETTI
	LAVIGNOLLE
	MARTIN-DUPONT
	DAVID-CHAUSSE
	J. RIVIERE
Chirurgie générale	LAUMONIER
	CHAVANNAZ
	VILLAR
	TINGAUD
	DEPAULIS
	DARMAILLACQ

	MM.
Obstétrique	CHASTRUSSE
	FAUGERE
Ophtalmologie	BESSIERE
	CORCELLE
	M. PORTMANN.
Oto-rhino-laryngologie	DESPONS
Dermatologie et syphiligraphie	LE COULANT
Pédiatrie et puériculture	VERGER
Médecine légale et méd. du trav.	L'EPEE
Electro-radiologie	LACHAPELE
Odonto-stomatologie	BENOIT
Urologie	LANGE
Neurologie et psychiatrie	BLANC
Pneumo-phtisiologie	FREOUR

COURS COMPLEMENTAIRES

	MM.
Médecine opératoire	LAUMONIER
Accouchements	CHASTRUSSE
	FAUGERE
Puériculture	VERGER
	PERY
Législation pharmaceutique	COUSTOU
Cryptogamie	LAUBIE
Obstétricie sociale	MAHON
Organographie et physiol. végét.	TEMPERE
Chimie biologique	MAROUEVILLE
Chimie analytique	BABIN
Pathologie chirurgicale	VILLAR
	CHAVANNAZ
	TINGAUD
	LAPORTE
	DARMAILLACQ

	MM.
Zoologie pharmaceutique	BAILENGER
Physiologie	BENELLI
Toxicologie et Hygiène	Mlle LARCEBAU
Phytopharmacie	CORTESI
Droit médical international	AUBY
Médecine légale	L'EPEE.
Séméiologie médicale	LAVIGNOLLE
Séméiologie chirurgicale	DEPAULIS
Embryologie	STOLL
Pathologie médicale	BERGOUIGNAN
	LENG-LEVY
	MORETTI
	DAVID-CHAUSSE
	MARTIN-DUPONT

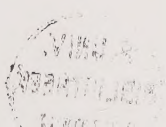
Le Secrétaire principal de la Faculté : GAYRAUD.

Par délibération du 5 août 1879, la Faculté a arrêté que les opinions émises dans les Thèses qui lui sont présentées doivent être considérées comme propres à leurs auteurs, et qu'elle entend ne leur donner ni approbation ni improbation.

R. UNIV. BIBLIOTHEEK

A MA FEMME

A MA FILLE



A LA MEMOIRE DE MES GRANDS-PARENTS

A MES PARENTS

A MES FRERES

A MES BEAUX-PARENTS

AUX MIENS

A MES AMIS

A MES CAMARADES ET AU PERSONNEL
DU LABORATOIRE D'HISTOLOGIE
DE LA FACULTE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE
DE BORDEAUX

A MES CAMARADES ET AU PERSONNEL
DU LABORATOIRE DE CHIMIE-BIOLOGIE
DE LA FACULTE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE
DE BORDEAUX

A MES CAMARADES ET AU PERSONNEL
DES LABORATOIRES DE BIOLOGIE PREVENTIVE
ET DE TOXICOLOGIE
DE LA CAISSE REGIONALE DE SECURITE SOCIALE

A MES CAMARADES DE L'ECOLE DE SANTE NAVALE

A LA DIRECTION, AUX MEDECINS ET AU PERSONNEL
DE LA FONDATION WALLERSTEIN

Au Docteur Jean DEVAUX

Témoignage d'amitié.

A NOS PROFESSEURS ET AUX OFFICIERS
DE L'ECOLE PRINCIPALE DU SERVICE DE SANTE
DE LA MARINE ET DES TROUPES COLONIALES

A NOS MAITRES DE LA FACULTE ET DES HOPITAUX

A Monsieur le Doyen R. SIGALAS

Témoignage de notre respectueuse reconnaissance.

A Monsieur le Docteur E. NEUZIL

Maître de conférences agrégé de Biochimie médicale,
Docteur ès Sciences.

En témoignage de notre profonde gratitude pour nous avoir inspiré le sujet de notre thèse et nous avoir guidé dans notre travail.

A Monsieur le Médecin Général de 1re Classe TABET

Directeur de l'Ecole principale du Service de Santé
de la Marine et des Troupes Coloniales,
Spécialiste des Hôpitaux Maritimes,
Commandeur de la Légion d'honneur,
Commandeur de l'Ordre de la Santé Publique,
Officier du Mérite Maritime.

A Monsieur le Médecin en Chef de 1re Classe CONSTANS

Sous-Directeur de l'Ecole Principale du Service de Santé,
de la Marine et des Troupes Coloniales,
Spécialiste des Hôpitaux Maritimes,
Officier de la Légion d'Honneur,
Croix de Guerre 1939-1945.

A NOS JUGES

Monsieur le Docteur R. STOLL

Chargé des fonctions de Maître de conférences agrégé d'Histologie,
Docteur ès Sciences,
Officier d'Académie.

En témoignage de notre reconnaissance pour l'intérêt toujours si bienveillant qu'il nous a réservé.

Monsieur le Professeur R. PAUTRIZEL

Docteur ès Sciences,
Directeur du Laboratoire départemental de Sérologie,
Expert de l'Organisation Mondiale de la Santé,
Croix de Guerre 1939-1945,
Officier d'Académie.

En hommage respectueux pour l'enseignement qu'il nous a prodigué.

Monsieur le Professeur F. TAYEAU

Professeur de Chimie biologique et médicale,
Docteur ès Sciences,
Officier de l'Instruction publique,
Médaille d'Honneur du Service de Santé de la Marine.

Nous le remercions de nous avoir accueilli dans son laboratoire et nous lui exprimons notre gratitude pour les conseils judicieux qu'il nous a donnés.

A NOTRE PRESIDENT DE THESE

Monsieur le Professeur G. MAYER

Professeur d'Histologie et d'Embryologie,
Officier d'Académie.

Nous conserverons un excellent souvenir des trois années passées dans votre laboratoire. Nous vous remercions de la formation que vous nous avez donnée, tant par vos cours que par vos conseils.

C'est un grand honneur pour nous de vous avoir comme Président de thèse. Nous vous en exprimons notre profonde gratitude.

INTRODUCTION

Un certain nombre de cellules ayant des caractères et des propriétés identiques, réparties dans tout l'organisme et ne constituant pas un organe propre, pose un des problèmes les plus complexes de l'histologie.

La première caractéristique de ces cellules, celle qui les a différenciées dès le début des autres cellules, est la fixation de colorant. Et c'est bien avant que l'on connaisse la théorie de la coloration vitale que différents chercheurs décrirent des cellules qui se coloraient électivement à la suite de l'injection d'un colorant dans l'organisme.

Virchow, en 1869, parle des ganglions lymphatiques ; Billroth précise même et indique les cellules du réticulum comme étant celles qui absorbent les colorants. Kuppfer, en 1876, décrit les cellules qui porteront son nom. Mais en même temps, Ranvier découvre des cellules douées de propriétés phagocytaires, situées en dehors de tout organe précis, dans le tissu conjonctif.

Donc, dès ce moment, en 1891, nous sommes en possession des éléments fondamentaux d'un système dont l'importance va croître de jour en jour. Ces cellules, comme le décrivent, tant Metchnikoff que Marchand, existent à l'état libre ou fixées dans divers organes, peuvent se trans-

former d'éléments fixes en éléments mobiles et sont douées des propriétés de phagocytose et en particulier celles de fixer les colorants.

En même temps, le principe et les modalités de la coloration vitale étaient découverts. Les cellules capables de fixer les colorants vitaux sont décrites, et GOLDMANN, en 1909, pouvait démontrer que les clasmatocytes de RANVIER, les macrophages de METCHNIKOFF et les chromophiles de RIBBERT, étaient les mêmes cellules. Le terme d'histiocyte commence à apparaître.

En 1913, ASCHOFF et LANDAU retrouvent dans leurs travaux des cellules qui ont la même origine, qui peuvent se transformer les unes les autres, qui sont douées de la propriété de phagocyter et qui peuvent se colorer vitalement. Ils se trouvaient donc devant les différents aspects, embryologique, morphologique et physiologique, d'un système. Ils n'envisagèrent que l'aspect morphologique et voulurent décrire un appareil précis, contenant tant de cellules, situées à tel endroit, dans tel et tel organe. Et c'est un terme morphologique, le système réticulo-endothélial, qu'ils donnèrent à cet ensemble cellulaire.

Ils considéraient deux formes de ce système, une forme large avec des cellules fixes et des cellules mobiles, et une forme limitée ne comprenant que les éléments fixes. Les cellules fixes comprenaient les cellules des divers réticulums, les cellules endothéliales et les cellules de KUPPFER du foie ; les cellules libres étant représentées par les macrophages et les monocytes. De même, KIYONO nomme les éléments réticulo-endothéliaux proprement dits, histioblastes, par opposition aux histiocytes, les premiers étant fixes et les seconds mobiles.

A leur suite, d'autres auteurs firent entrer dans ce système diverses cellules, tandis que des critiques s'élevaient déjà.

Siegmund, en 1923, rappelle l'origine mésenchymateuse de ces cellules. Rouslacroix, en 1931, est le premier à envisager cet appareil comme étant une réserve de mésenchyme jeune et indifférencié, impossible à limiter.

Midy, en 1936, propose le terme de conjonctif histiocytaire, englobant :

— Le tissu conjonctif ;

— L'ancien système d'Aschoff ;

— Le réseau tropho-pigmentaire de Borrel-Masson ;

— Le système lacunaire d'Achard.

En 1940, Ogata revient à la conception d'Aschoff, mais en lui donnant le nom de système rétothélial.

Etat actuel de la question.

A. - **Les dénominations :**

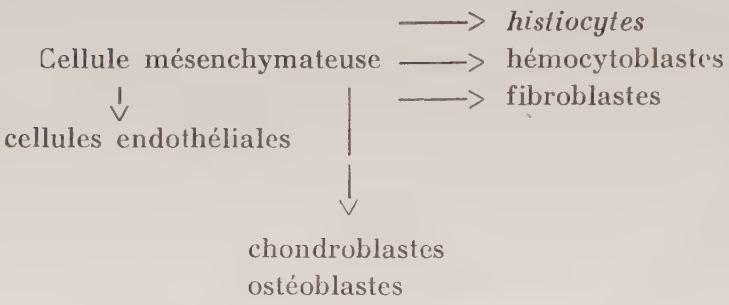
Si le terme de système réticulo-endothélial est à peu près abandonné, l'accord n'est tout de même pas fait sur une dénomination unique. Chèvremont parle de système histiocytaire, tandis que Cazal propose les termes de système réticulo-histiocytaire ou de mésenchyme actif, selon que l'on considère l'aspect morphologique ou physiologique de la question.

B. - **Caractères généraux :**

I. - Origine embryologique.

Toutes les cellules de ce système dérivent de la cellule mésenchymateuse. Elles représenteraient une réserve de cellules qui pourront se différencier vers plusieurs rôles.

Cazal schématise ainsi cette origine :



II. - Aspect morphologique.

A la suite des travaux de Thomas, puis de Chèvremont, on peut admettre à l'heure actuelle qu'on a affaire à une seule et même cellule pouvant se présenter sous les quatre formes suivantes :

— Histiocytes : ce sont des cellules allongées, à pseudopodes longs et fins ;

— Macrophages : cellules libres rondes avec une membrane ondulante ;

— Cellules épithélioïdes : petites, aplaties, ressemblant à des cellules épithéliales ;

— Cellules géantes : volumineux éléments renfermant un grand nombre de noyaux.

III. - Propriétés fonctionnelles.

a) *Coloration vitale.* — Les cellules histiocytaires possèdent la propriété de fixer dans leur protoplasme certains colorants dits colorants vitaux, se présentant comme des colloïdes à charge électro-négative.

Cette propriété n'est pas suffisante pour faire classer une cellule parmi le système histiocytaire. En effet, par surcharge de colorant, des fibrocytes et diverses autres cellules peuvent en fixer.

b) *Athrocytose.* — C'est le fait pour une cellule de fixer certaines particules (colorants vitaux, carbone, poussière). Cette propriété, tout en étant une caractéristique des cellules histiocytaires, se retrouve aussi dans les tubes contournés du rein.

C'est Smulders qui précisa le terme d'athrocytose, d'après les idées de Gérard et Cordier. Il en fixa les modalités, d'après la taille particulaire.

c) *Rôle dans divers métabolismes.* — Les cellules histiocytaires participent activement au métabolisme du fer, du cholestérol, des lipides et des vitamines, principalement les vitamines A, D et C.

d) *Plasticité.* — Un histiocyte peut se mobiliser en cas de besoin, se transformer en macrophage et éventuellement en cellule épithélioïde ou en cellule géante. Mais, de plus, un certain nombre d'auteurs ont prouvé par la culture de tissus, que beaucoup d'éléments tissulaires se transformaient naturellement ou sous diverses influences en cellules histiocytaires.

Citons les travaux de Thomas (1935, 1938) sur l'entoblaste vitellin de la vésicule ombilicale ; de Chèvremont (1940, 1942) sur le mésenchyme, le tissu conjonctif sous-cutané, les muscles squelettiques. La choline activant d'ailleurs, dans d'énormes proportions, cette transformation, de même que l'acétylcholine. Frédéric (1950-1951) transforme les cellules hépatiques, tandis que Dupré (1950) voyait des éléments musculaires et des fibrocytes opérer une transformation histiocytaire sous l'effet de la lécithine.

e) *Résistance.* — Les cellules histiocytaires semblent posséder une résistance à l'égard des conditions défavorables, beaucoup plus grande que les autres cellules de l'organisme.

C. - **Régulation :**

1° *Cinétique.* — Halpern et ses collaborateurs ont montré l'évolution cinétique de la fixation par la cellule histiocytaire, évolution obéissant à des règles immuables.

2° *Rôle de la choline.* — Chèvremont a mis en évidence l'augmentation du taux de choline dans certains organes ou son apparition dans d'autres qui en sont dépourvus à l'état normal. Cette augmentation précède l'apparition en plus grande quantité de cellules histiocytaires. On peut donc envisager une action favorisante de la choline sur la transformation histiocytaire.

3° *Rôle de l'histamine.* — L'histamine a la propriété d'augmenter dans de grandes proportions le nombre et les qualités des différentes cellules du système histiocytaire. Les antihistaminiques possèdent la propriété contraire.

D. - **Rôle dans l'organisme :**

1° *Défense de l'organisme.* — On aborde ici un des rôles les plus importants du système histiocytaire. Son importance dépassant largement le cadre de notre travail, citons simplement l'importance de la phagocytose d'une part et rappelons les travaux de Boivin et Delaunay et, d'autre part, la participation des cellules histiocytaires dans la formation des anticorps. (Voir les travaux de Sabin, puis de Dougherty, Chase et White.)

2° *Production de tumeurs.* — On groupe actuellement sous le nom de réticuloses un ensemble d'affections ayant pour caractère commun le fait qu'elles se développent à partir des éléments du système histiocytaire.

Conclusions.

La notion du système histiocytaire a évolué de la façon suivante :

— Des observations éparses sont rassemblées par Aschoff qui en fait un système morphologique restreint.

— L'élargissement de ce système.

— Le retour à un système étroit.

— Un nouvel élargissement, non plus morphologique mais envisageant tous les aspects dans tous les domaines du système primitif d'Aschoff.

PREMIERE PARTIE

LES COLORANTS DE SYNTHÈSE

La différenciation des vibrations lumineuses de diverses longueurs d'onde peut être démontrée chez les êtres vivants les plus inférieurs et il n'est pas exagéré de soutenir que la vie et la couleur sont intimement liées, puisque toute l'énergie disponible sur notre planète provient en définitive de la lumière solaire, si l'on excepte la part si faible de la radioactivité naturelle.

Depuis qu'il existe, l'homme a toujours cherché à décorer les objets dont il faisait usage, aussi bien que son biotope, de taches colorées rappelant celles de la pallette si riche que lui offrait la Nature. Pendant des siècles, il n'a utilisé à cet effet que des substances colorées d'origine naturelle. Les ocres, les argiles, différents minéraux, donnèrent aux vases, aux céramiques, aux émaux, ces teintes magnifiques qui font encore notre admiration dans les musées d'antiquité. Les colorants biologiques d'origine végétale ou animale, sont apparus certainement beaucoup plus tard. Les Egyptiens connaissaient la teinture des étoffes, qu'ils réalisaient avec la gaude, la garance, l'indigo, la pourpre ou le kermès. Le Moyen-Age enrichit cette gamme avec le Bois rouge du Brésil, l'Orseille retirée de certains lichens, le Bois de Campêche et le Jaune Indien.

L'essor de la chimie, au XVIII[e] siècle et au début du siècle suivant, donne à l'industrie une gamme assez riche

de colorants minéraux encore employés aujourd'hui : Bleu de Prusse, Bleu de Cobalt, Outre-Mer artificiel, Vert de Guignet. Les colorants organiques de synthèse, qui de nos jours sont de loin les plus employés, sont également les derniers venus.

On célèbrera en effet, en 1956, le centenaire de la synthèse du premier colorant organique artificiel. C'est à l'Angleterre, en la personne de PERKIN, que nous devons cette étape décisive de la chimie organique. Le jeune PERKIN, âgé seulement de dix-huit ans, travaillait à Londres dans le laboratoire du professeur HOFMANN, au Collège Royal de chimie. C'est en essayant de réaliser la synthèse de la quinine, par oxydation bichromique de l'allyl-toluidine que William-Henri PERKIN obtint une magnifique substance mauve, il s'aperçut bientôt que ce même produit pouvait être préparé à partir de la simple aniline. La « mauvéine » ainsi réalisée teignait la laine et le coton avec un résultat bien supérieur à tout ce qui été réalisé jusqu'alors. PERKIN eut le mérite de prévoir l'importance industrielle du nouveau colorant et lança avec succès sur le marché sa mauvéine, que les timbres de un penny à l'effigie de la reine Victoria allaient bientôt faire connaître au monde entier.

A partir de 1856, les découvertes dans le domaine des colorants se précipitent. Un autre chercheur anglais, Peter GRIESS, chimiste à la brasserie Alsopp de Burton-on-Trent, découvre bientôt la diazoréaction tandis qu'en France, VERGUIN, en 1859, met au point la fabrication de la fuschine dans les laboratoires des Etablissements Renard et Franc, dont il était le chimiste. L'année suivante, GIRARD et de LAIRE synthétisent les Bleus de Lyon, NICHOLSON trouve la Phosphine. HOFMANN rentre bientôt en Allemagne, où il crée de toutes pièces une industrie de colorants chimiques; sous sa vigoureuse impulsion, les

centres de recherches et les usines se multiplient et jusqu'en 1914, l'Allemagne devait acquérir la suprématie incontestée dans ce domaine, dans lequel seule la Suisse pouvait pratiquement la suivre.

Après la première guerre mondiale, de nombreux pays développent leur industrie nationale de colorants et le nombre de dérivés disponibles de nos jours est considérable : les quatre gros volumes des Schulz's Tabellen der Farbstoffen, répertoire le plus documenté, sont cependant loin d'englober tous les colorants organiques de synthèse connus.

Il existe des relations chimiques assez précises entre la couleur et la constitution chimique. Otto N. Witt, en 1876, apporta pour la première fois des éclaircissements sur ce point. La couleur provient de l'existence dans la molécule d'un groupement caractéristique qui constitue le chromophore. L'introduction de ce chromophore dans une substance non colorée, la transforme en chromogène, lequel n'est pas obligatoirement un colorant : un colorant est un chromogène capable de se fixer sur un support, papier ou textile. Habituellement, les colorants, outre le groupement chromophore, renferment dans leurs molécules des groupements auxochromes qui sont les véritables groupements responsables de la teinture.

On a l'habitude de classer les colorants en un petit nombre de familles chimiques qui se différencient les unes des autres par la nature du groupement chromophore. On distingue ainsi :

— Les azoïques, renfermant le groupement — N = N — (orangé II, orangé III, chrysoïdine R, brun de Bismarck);

— Les colorants nitrosés, avec le groupe d'atomes — N = O — (vert naphtol B);

— Les colorants nitrés, dont le chromophore — NO2 — se retrouve dans l'acide picrique et le jaune naphtol S; ;

— Les colorants cétoniques, surtout représentés par des dérivés naturels que l'on réalise maintenant par synthèse (lutéoline, fisétine, rhamnétine);

— Les colorants pyrazoloniques;

— Les dérivés du diphénylméthane et du triphénylméthane;

— Les indamines, les indophénols, les indoanilines, les colorants aziniques, oxaziniques, thiaziniques, les colorants anthraquinoniques.

Il convient de remarquer que dans le groupe des colorants organiques de synthèse, un grand nombre de composés sont susceptibles de s'ioniser. Le groupement chromophore peut être alors supporté par l'anion ou par le cation; dans le premier cas, le colorant possèdera une charge négative : on dit qu'il s'agit d'un colorant acide ou encore d'un colorant électronégatif; lorsque le groupement chromophore se trouve sur le cation le colorant est au contraire un colorant basique ou électropositif. Le Bleu Trypan et le Bleu de Méthylène constituent respectivement des exemples de ces deux variétés de colorants.

LES COLORANTS VITAUX

La notion de coloration vitale pourrait trouver son origine dans les tatouages, dont l'usage était répandu déjà dans la Chine ancienne. Cependant, la première utilisation scientifique des colorants comme moyen d'investigation biologique semble remonter au médecin Antoine Missaud qui, dès 1567, montrait à Paris que l'on pouvait colorer les os d'un animal vivant en ajoutant de la garance à sa nourriture. Ce même colorant naturel permit, au XVIII[e] siècle, à de nombreux investigateurs (Rudfort, Gibson, Belchir et Duhamel) d'étudier le mécanisme de la croissance du squelette.

Sans vouloir faire l'historique détaillé de la coloration vitale, nous ne saurions passer sous silence les étapes principales de cette technique. En 1841, Dujardin démontre l'accumulation du carmin dans la région buccale de certains infusoires. L'introduction de la coloration vitale en histologie est surtout l'œuvre de l'école allemande. Dès 1874, Heidenhain précise le fonctionnement rénal grâce à l'indigo-carmin ; en 1885, Ehrlich réalise pour la première fois la coloration vitale de certains éléments du système nerveux avec le Bleu de Méthylène. A la suite de ses précurseurs, le nombre de colorants susceptibles d'être injectés à l'animal sans faire preuve d'une toxicité trop grande, toute en réalisant des colorations vitales sélectives, s'accroît dans des proportions considérables. La Thionine, le Violet de Méthylène, le Bleu de Nil, le Bleu de Toluidine, viennent enrichir la gamme des colorants vitaux ; le Carmin lithiné avec Ribbert en 1904, le Bleu Trypan avec Goldmann en 1909, le Vert Janus avec Michaelis en 1910, se partagent bientôt la faveur des expérimentateurs.

Il apparut rapidement qu'il était nécessaire d'effectuer une distinction parmi les différents colorants vitaux : les uns, particulièrement peu toxiques, méritaient réellement le nom de colorants vitaux, tandis que les autres perturbaient fortement le métabolisme cellulaire, amenant plus ou moins rapidement la dégénérescence et la mort de la cellule : pour ce dernier groupe on préfère, à l'heure actuelle, le nom de colorants supra vitaux.

Comme le montre le tableau ci-dessous, les colorants vitaux employés à l'heure actuelle appartiennent à différentes familles chimiques.

Classification des principaux colorants vitaux.

A. - Colorants basiques.

1° *Thiazines :*

Bleu de Méthylène.
Bleu de Toluidine.
Azur de Méthylène.

2° *Oxazines :*

Bleu de Nil.
Bleu de Crésyl brillant.
Violet de Crésyl.

3° *Azines :*

Rouge neutre.
Vert janus B.

4° *Triphénylméthanes rosalines :*

Violet de Méthyle 5 B.
Violet dahlia.
Bleu Victoria.

B. - Colorants acides.

1° *Oxyquinone :*

Alizarine.

2° *Tétrazoïque :*

Bleu Trypan.
Bleu Pyrrol.

Leur sélectivité dépend à la fois de leurs signes électrique et de leur constitution chimique. Rares sont ceux qui réalisent les caractéristiques du colorant vital idéal :

— *Faible toxicité.*

Par ordre de toxicité décroissante on peut classer :

a) Violet de Méthyle, Vert Dahlia ;
b) Bleu de Nil, Bleu de Crésyl, Bleu Trypan ;
c) Rouge neutre ;
d) Rouge Congo.

— *Forte solubilité dans l'eau,* associée à un pouvoir colorant élevé, ce qui permet l'utilisation des solutions diluées.

— *Emploi facile.*

— *Faible prix de revient.*

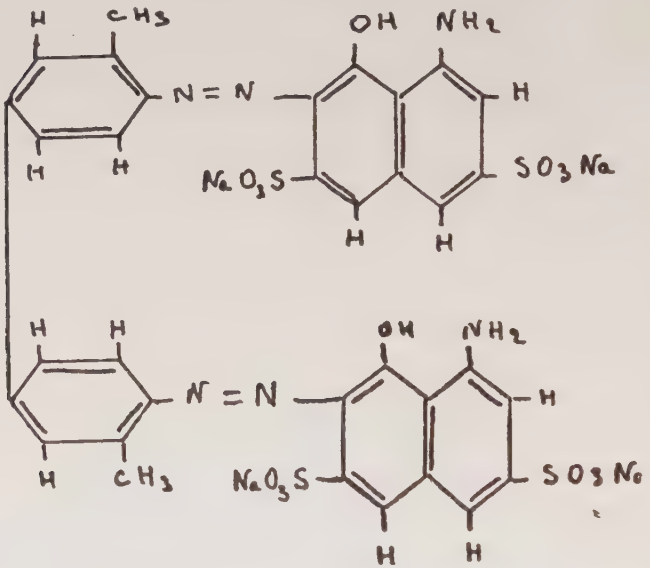
— *Belle nuance de teinte.*

— *Sélectivité de la coloration.*

Plusieurs théories ont été émises pour expliquer la coloration vitale. Celle d'Overton (1900) fait intervenir uniquement la solubilité des colorants dans les lipides cellulaires. Beauchamp, au contraire, en 1909, pense que la charge électrique du colorant joue un rôle important, la coloration vitale pouvant être considérée comme l'interaction d'une solution colloïdale de colorant sur la solution colloïdale que constitue le protoplasme. En fait, les deux hypothèses doivent être partiellement vraies, puisque parmi les colorants vitaux ou supravitaux, les uns sont dépourvus de charge électrique, tandis que les colorants ionisés se répartissent d'une manière différente selon qu'ils sont acides ou basiques.

Le BLEU TRYPAN

Le Bleu Trypan est un colorant tétrazoïque, résultant de la diazotation d'un produit de substitution de la benzidine : la tolidine ; suivie d'une copulation avec un amino-naphtol-disulfonate de sodium.



Propriétés physico-chimiques :

Le Bleu Trypan se présente sous la forme d'une poudre bleue, soluble dans trente parties d'eau, insoluble dans l'alcool absolu, la glycérine anhydre et dans les huiles.

En solution, c'est un colloïde électronégatif de *p*H acide de 6,10. Son coefficient de diffusion dans l'eau est de 0,299.

Son rayon particulaire est de 6,6 Å.

Utilisation thérapeutique :

On l'a utilisé dans les traitements de l'encéphalite léthargique et de la maladie de Parkinson. Il faut alors

l'injecter en voie intra-veineuse, la voie digestive étant inefficace, et la voie sous-cutanée donnant lieu à la formation d'abcès.

On l'emploie encore dans le traitement des trypanosomiases et des piroplasmoses des bêtes à cornes.

Utilisation en biologie :

C'est Bouffard qui, le premier, en 1904, utilisa le Bleu Trypan, dans le but de mettre en évidence les cellules de l'organisme prenant les colorants vitaux.

Le Bleu Trypan présente en effet les caractéristiques nécessaires à un colorant pour être utilisé en coloration vitale. Il est extrêmement employé.

Inconvénients :

1° Ce n'est pas un colorant pur. La simple injection de Bleu Trypan à un animal permet de constater une élimination urinaire d'un composé rouge, tandis que la partie bleu reste fixée.

La chromatographie et l'étude de la dialyse faites plus loin démontreront mieux cet inconvénient.

2° C'est un colorant très toxique. Kiyono le range sur ce point dans son groupe I : toxicité importante, tant générale que vis-à-vis du foie.

3° C'est en utilisant ce colorant que Gillmann et ses collaborateurs, entre 1948 et 1951, ont pu créer chez des animaux des syndromes tout à fait comparables aux réticuloses humaines, tels que maladie de Hodgkin, lymphomes, maladie de Banti, etc...

Ces travaux ont été repris et confirmés par Simpson en 1952 et Marshall en 1953.

En 1954, Verne et ses collaborateurs ont montré qu'on observait des syndromes de réticuloses avec des injections de Bleu Trypan, et que ces syndromes variaient avec le

sexe de l'animal ; la réticulose étant plus marquée chez le mâle que chez la femelle.

Il est possible que le Bleu Trypan soit cancérigène, du fait que c'est un dérivé de la tolidine, qui elle, a bien cette propriété (Spitz, Maguigan et Dobriner, 1950).

Les inconvénients du Bleu Trypan, en tant que colorant vital, sont par conséquent assez importants, pour qu'on envisage l'étude systématique de tous produits capables, non peut-être de le remplacer, mais tout au moins de le suppléer dans certaines de ses utilisations.

LES PHTALOCYANINES

Le Bleu Monosol.

La découverte des phtalocyanines remonte à 1926. Les chimistes de la Scottish Dyes Ldt. étaient gênés par une impureté fortement colorée en bleu, qui apparaissait au cours de certaines fabrications de phtalimide ; il apparut rapidement que l'action de l'ammoniaque sur l'anhydride phtalique, qui conduit normalement à la phtalimide, ne donne lieu à l'impureté bleue qu'en présence de fer ou d'autres métaux divalents.

Le professeur Linstead, de l'Imperial College of Technology de Londres, s'attaqua au problème de la structure chimique de cette impureté. Le produit bleu avait comme formule globale :

$$(C_8 H_4 N_2)_4 Fe,$$

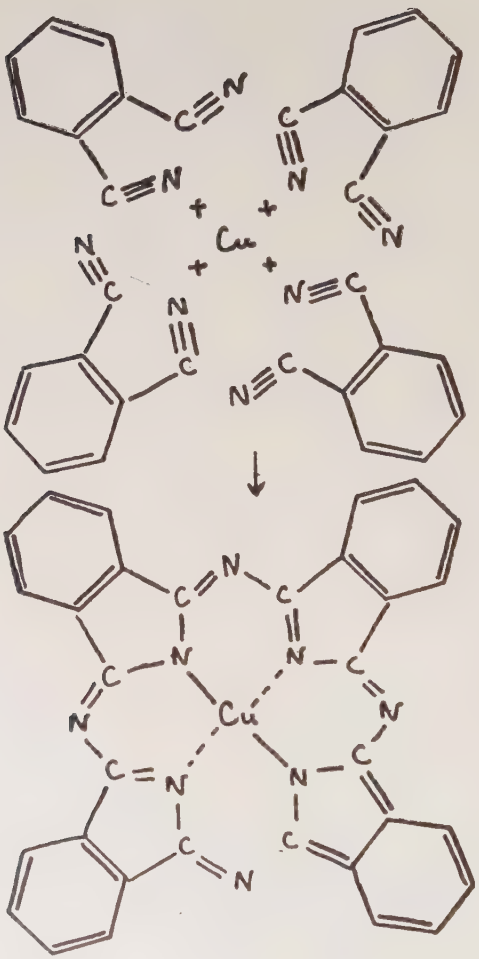
et d'une manière plus générale :

$$(C_8 H_4 N_2)_4 M,$$

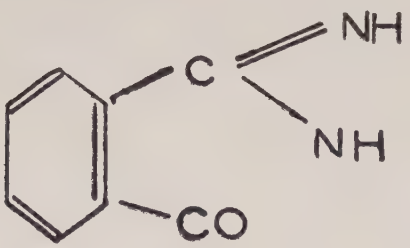
dans laquelle M représente du cuivre, du magnésium, du calcium ou même dans certains cas, un sel de sodium ou de platine.

Le composé bleu pouvait être préparé avec un rendement bien meilleur, par simple chauffage du phtalonitrile

en présence de cuivre. LINSTEAD fut alors conduit à la représentation suivante :



Il donna à ce composé le nom de phtalocyanine cuprique. La synthèse est également possible à partir de l'imidophtalimide (o-cyanobenzamide) :



Il est à signaler que, en 1927, Diesbach et Van der Weid avaient préparé la phtalycyanine de cuivre, mais n'avaient pas identifié le produit bleu obtenu.

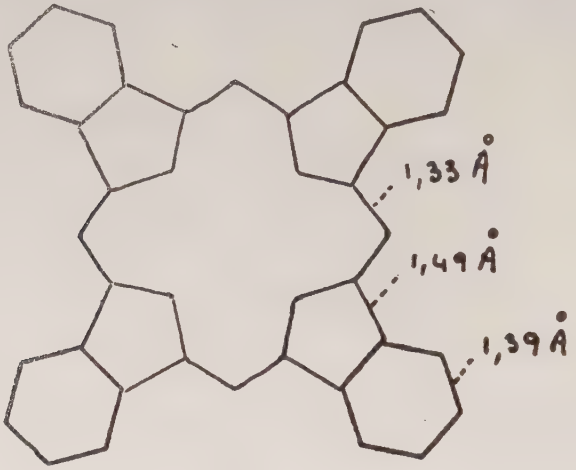
Le chimiste londonien remarqua que dans les phtalocyanines où le métal est représenté par du fer, du cuivre ou du platine, il est impossible d'éliminer cet atome de métal, sans détruire la molécule ; au contraire, avec les phtalocyanines magnésiennes, calciques ou sodiques, un traitement par un acide en présence d'alcool méthylique conduit à un composé bleu, de formule globale :

$$(C_{32}H_{16}N_8)H_2,$$

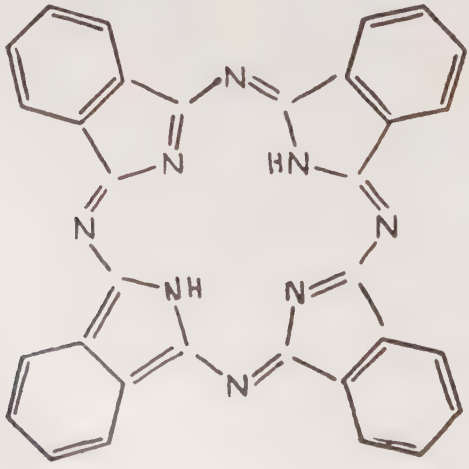
que l'on peut appeler la phtalocyanine libre.

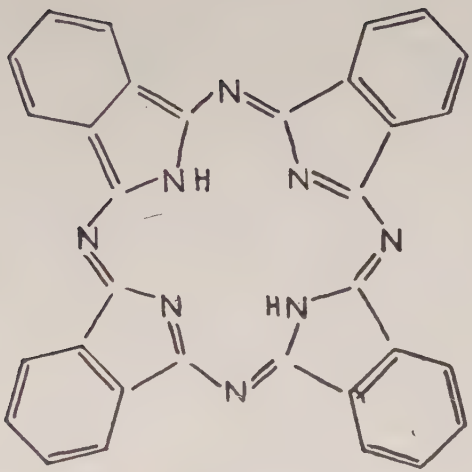
L'étude de la structure chimique fine de cette phtalocyanine a donné lieu à de fort intéressantes considérations. Nous devons à Robertson (1935-1936) des renseignements fort détaillés sur la forme de cette molécule, renseignements fournis par les diagrammes de diffraction de

rayons X. La molécule est plane et les distances interatomiques sont données par le schéma ci-dessous :

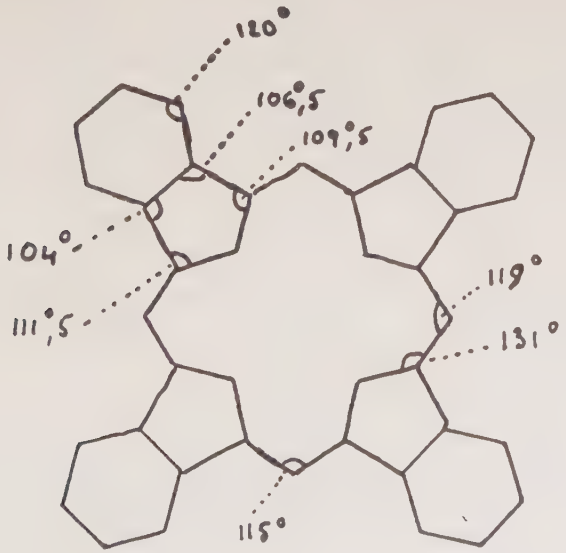


On remarquera que les liaisons entre les atomes de carbone et d'azote ont toujours la même valeur de 1,35 Å; ceci implique une résonnance entre les liaisons simples et les doubles liaisons, et la structure de la phtalocyanine libre doit donc être considérée comme une structure de résonnance répondant aux deux schémas suivants :

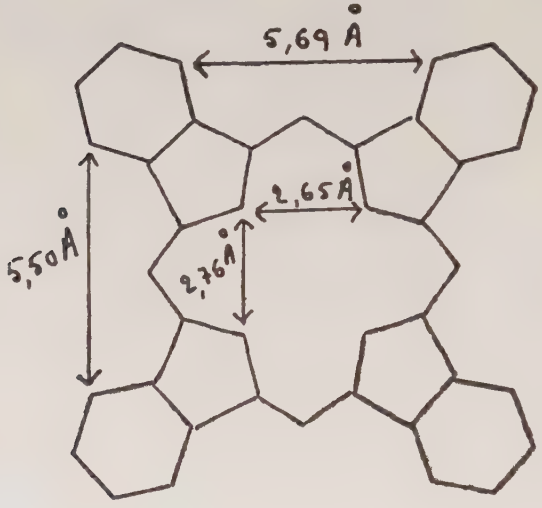




Remarquons que les formules ci-dessus ne répondent pas parfaitement à la réalité, puisque les quatre noyaux benziniques étant équivalents au point de vue structural, il n'existe pas une place bien définie dans la molécule pour le noyau à forme orthoquinonique. De plus, la molécule ne possède pas d'axe de symétrie quaternaire, car les valeurs angulaires ne se répètent pas parfaitement dans la molécule,



pas plus que les distances entre les atomes d'azote des noyaux pentagonaux ne sont les mêmes :



Les phtalocyanines nous apparaissent donc comme voisines du noyau de la porphine ; elles en diffèrent par le fait que les noyaux pentagonaux de nature pyrrolique, au lieu d'être reliés l'un à l'autre par un groupement méthinique :

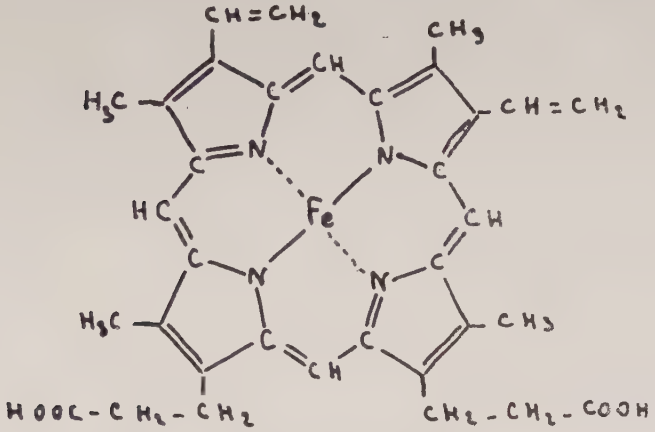
$$= CH —$$

au niveau des carbones, sont ici reliés par un simple atome d'azote :

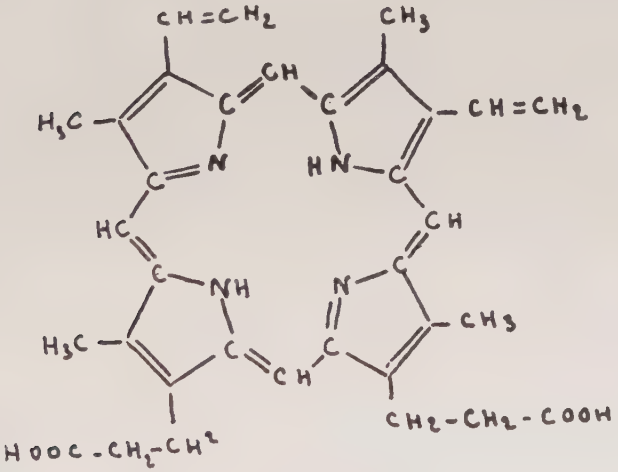
$$= N —$$

Le noyau de base des phtalocyanines est donc une « tétrazoporphine » et la phtalocyanine elle-même nous apparaît comme une tétrazobenzoporphine. La parenté

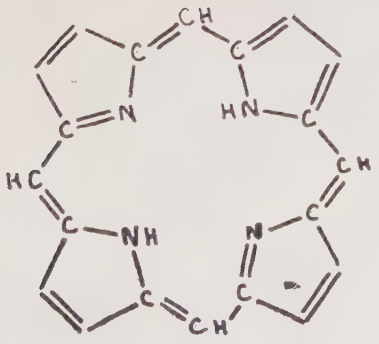
avec les composés porphyriniques naturels apparaît dans les schémas ci-dessous :



Hème



Proto Porphine



Porphine

L'intérêt des phtalocyanines n'est pas que théorique : la phtalocyanine de cuivre s'est révélée un pigment bleu d'une rare stabilité à la lumière et aux agents chimiques ; elle a connu et connaît encore un grand succès commercial, sous le nom de Bleu Monastral (nom déposé de l'Imperial Chemical Industries) ou de Bleu Héliogène (nom déposé de l'I.G. Farben). De plus, les phtalocyanines se prêtent parfaitement à l'impression trichrome.

La grande stabilité chimique des phtalocyanines (il est possible de les sublimer à une température supérieure à 400° C.) est malheureusement handicapée, pour certains usages particuliers, par la quasi insolubilité de leurs composés : seul le chloronaphtalène les dissout faiblement. Aussi, de nombreux chercheurs et plus particulièrement ceux de l'Imperial Chemical Industries, ont-ils cherché à réaliser des dérivés de phtalocyanines utilisables pour la teinture. Des dérivés contenant un radical soufré, un groupement solubilisant de nature pyridinique, des dérivés carboxylés ont été proposés avec plus ou moins de succès. Parmi ces dérivés hydrosolubles, deux ont retenu plus particulièrement l'attention des biologistes :

— LE BLEU ALCIAN 8 GS, dont la structure n'a pas encore été complètement révélée. Ce colorant, entre les mains de Steedman (1950) et de Lison (1954), s'est montré applicable aux colorations sélectives des mucines, se fixant particulièrement dans les tissus riches en acides chondroïtine et mucoïtine-sulfuriques.

— LES BLEUS MONOSOL 2 G et 2 GS, dérivés sulfonés de la phtalocyanine de cuivre, étudiés par Neuzil et Bailenger et dont nous avons continué les investigations. La structure précise de ces Bleus Monosol (degré de sulfo-

nation et emplacement des radicaux sulfoniques) ne sont pas connus. On sait seulement que les Bleus Monosol sont obtenus à partir du Bleu Monastral par une sulfonation que l'on arrête lorsque l'on atteint un certain degré de solubilité.

Les produits que nous avons utilisés dans notre travail nous ont été fournis, par l'intermédiaire de M. le Docteur Neuzil, par la Dyestuffs Division de la Imperial Chemical Industries Ldt., Hexagon House, Blackley, Manchester 9, que nous sommes heureux de remercier ici.

DEUXIEME PARTIE

ÉTUDE PHYSICO-CHIMIQUE

L'introduction d'une substance chimique parmi les colorants vitaux pose un certain nombre de problèmes. C'est l'étude physico-chimique qui va permettre de les résoudre.

La première question qui se pose est de savoir si ce corps est homogène. C'est particulièrement à l'aide de la chromatographie qu'une réponse sera donnée.

La deuxième question qui se pose est de savoir si l'introduction dans l'organisme du produit envisagé peut se faire sans risque. La réponse à cette question amène une étude du *p*H (et de l'évolution de ce *p*H suivant les modifications du milieu), de la tension superficielle et de la viscosité.

Enfin, l'athrocytose d'un colorant étant régie par la taille particulaire de celui-ci, il est intéressant de la connaître aussi exactement que possible. Cette taille particulaire est donnée par la formule de Stokes-Einstein faisant intervenir entre autre le coefficient de diffusion et la viscosité. On peut encore employer, pour déterminer la taille particulaire, la dialysabilité estimée par le passage à travers une membrane de cellophane.

Dans le but de résoudre une partie des questions que l'on peut se poser en envisageant l'introduction du Bleu Monosol parmi les colorants vitaux, nous nous sommes livrés à des recherches portant à la fois sur le Bleu Trypan et sur le Bleu Monosol.

C'est ainsi que nous avons fait pour nos deux colorants :

— Une étude chromatographique ;

— Une étude potentiométrique ;

— Une étude de la tension superficielle et de la viscosité ;

— Une étude de la dialyse.

ÉTUDE CHROMATOGRAPHIQUE

I. - Chromatographie du Bleu Trypan, marque Geigy.

On a utilisé la chromatographie sur papier, par méthode ascendante.

Les papiers Schleicher et Schüll n° 2040 b, 2043 b et 1101 ont été essayés. Le 1101 ne nous a pas donné de bons résultats. Le 2040 b, par contre, semble être le meilleur. Les feuilles de papier avaient une hauteur de 40 centimètres ; la longueur du front du solvant était de 33 centimètres. La ligne de dépôt des spots se trouvait à 4 centimètres de l'extrémité inférieure du papier.

Nous avons travaillé à une température de 18 degrés.

La quantité de colorant était de 10 milligrammes d'une solution à 0,75 % dans l'eau distillée par spot.

Les milieux suivants ont été essayés :

1. Phénol saturé d'eau.
2. Phénol saturé d'une solution aqueuse renfermant 3 % d'ammoniaque.
3. Phénol saturé d'une solution aqueuse renfermant 10 % d'ammoniaque.
4. Phénol saturé d'une solution aqueuse renfermant 20 % d'ammoniaque.
5. Phénol saturé d'une solution aqueuse renfermant 10 % d'acide acétique.
6. Phénol saturé d'une solution aqueuse renfermant 20 % d'acide acétique.

Les résultats sont à peu près concordants sauf en milieu ammoniaque à partir de 10 %, où les taches II et V ont disparu et où la tache VII semble se dédoubler.

I. Couleur mauve. Rf : 0,34 à 0,46. Visible en ultra-violet.

II. Couleur bleu-violet. Rf : 0,30 à 0,42. Invisible en ultra-violet.

III. Couleur rose-mauve. Rf : 0,28 à 0,39. A peine visible en ultra-violet, sauf en milieu contenant 10 % ou plus d'ammoniaque, où elle est plus marquée.

IV. Couleur violet. Rf : 0,20 à 0,27. Visible en ultra-violet.

V. Couleur rose pâle en milieu Phénol-eau-3 % d'ammoniaque (papiers n° 2040 b et 2043 b). Rf : 0,20 à 0,22. Visible en ultra-violet.
Couleur bleu en milieu phénol-eau (papiers 2040 b et 2043 b) et phénol-eau-acide acétique (10 et 20 %). Rf : 0,17 à 0,23. Invisible en ultra-violet. Invisible avec les milieux phénol-eau (10 et 20 % d'ammoniaque).

VI. Couleur bleu avec le milieu phénol-eau 3 % d'ammoniaque (papiers n° 2040 b et 2043 b). Rf : 0,19 à 0,20. Invisible en ultra-violet.
Couleur rose avec les milieux phénol-eau (papiers n° 2040 b et 2043 b), phénol-eau 10 et 20 % d'ammoniaque, phénol-eau 10 et 20 % d'acide acétique. Rf : 0,14 à 0,19. Visible en ultra-violet.

VII. Couleur gris-bleu. Rf : 0,05 à 0,07. Visible en ultra-violet.
Cette tache est divisée en deux en milieu phénol-eau 10 et 20 % d'ammoniaque :
— Une tache bleue. Rf : 0,05 à 0,04. Invisible en ultra-violet.
— Une tache violette. Rf : 0,03 à 0,04. Visible en ultra-violet.

VIII. Couleur bleu foncé. Rf : 0,01 à 0,03. Invisible en ultra-violet.

Ces résultats sont rassemblés dans le tableau suivant :

SPOTS		Papier 2040 b → NUMÉROS DE MILIEUX						PAPIER 2043 b → N° des Milieux	
		1	2	3	4	5	6	1	2
I	Lum. visible	Mauve	Mauve	Mauve	Mauve	Mauve	Mauve	Mauve	Mauve
	U.V.	Visible	Visible	Visible	Visible	Visible	Visible	Visible	Visible
	Rf.	0,41	0,46	0,41	0,40	0,38	0,35	0,34	0,43
II	Lum. visible	Bleu violet	Bleu violet			Bleu violet	Bleu violet	Bleu violet	Bleu violet
	U.V.	Invisible	Invisible			Invisible	Invisible	Invisible	Invisible
	Rf.	0,36	0,42			0,32	0,30	0,30	0,37
III	Lum. visible	Rose mauve	Rose mauve	Rose mauve	Rose mauve	Rose mauve	Rose mauve	Rose mauve	Rose mauve
	U.V.	ε	ε	Visible	Visible	ε	ε	ε	ε
	Rf.	0,33	0,39	0,33	0,34	0,30	0,29	0,28	0,36
IV	Lum. visible	Violet	Violet	Violet	Violet	Violet	Violet	Violet	Violet
	U.V.	Visible	Visible	Visible	Visible	Visible	Visible	Visible	Visible
	Rf.	0,26	0,27	0,22	0,22	0,23	0,20	0,23	0,24
V	Lum. visible	Bleu	Rose pâle			Bleu	Bleu	Bleu	Rose pâle
	U.V.	Invisible	Visible			Invisible	Invisible	Visible	Invisible
	Rf.	0,23	0,22			0,20	0,17	0,21	0,20
VI	Lum. visible	Rose pâle	Bleu pâle	Rose pâle	Rose pâle	Rose pâle	Rose pâle	Rose pâle	Bleu pâle
	U.V.	Visible	Invisible	Visible	Visible	Visible	Visible	Invisible	Visible
	Rf.	0,19	0,20	0,18	0,18	0,16	0,14	0,16	0,19
VII	Lum. visible	Gris-bleu	Gris-bleu	Bleu | Violet	Bleu | Violet	Gris-bleu	Gris-bleu	Gris-bleu	Gris-bleu
	U.V.	Visible	Visible	Visible	Visible	Visible	Visible	Visible	Visible
	Rf.	0,07	0,06	0,05 | 0,04	0,04 | 0,03	0,06	0,05	0,07	0,05
VIII	Lum. visible	Bleu foncé	Bleu foncé	Bleu foncé	Bleu foncé	Bleu foncé	Bleu foncé	Bleu foncé	Bleu foncé
	U.V.	Invisible	Invisible	Invisible	Invisible	Invisible	Invisible	Invisible	Invisible
	Rf.	0,02	0,01	0,01	0,01	0,02	0,02	0,03	0,01

II. - **Chromatographie du Bleu Trypan, marque Grübler.**

La même technique est employée avec du papier Schleicher et Schüll n° 2040 b et le milieu phénol saturé d'une solution aqueuse.

D'une manière générale, on a une même allure d'ensemble avec trois groupes de spots.

— Le groupe le plus élevé se compose de 2 taches :
  — Couleur violet. Rf. : 0,36.
  — Couleur rose. Rf : 0,31.

Les deux taches n'en font qu'une en ultra-violet.

— Le groupe du milieu comprend aussi 2 taches :
  — Couleur violet. Rf : 0,21. Visible en ultra-violet.
  — Couleur violet. Rf : 0,21. Visible en ultra-violet.

— Le groupe le moins élevé comprend 3 taches :
  — Couleur mauve. Rf : 0,07. Visible en ultra-violet.
  — Couleur bleu roi. Rf : 0,05. Invisible en ultra-violet.
  — Couleur bleu violet. Rf : 0,02. Visible en ultra-violet.

III. - **Chromatographie du Bleu Monosol.**

Les milieux suivants sont essayés avec le papier Schleicher et Schüll n° 2040 b :

1. Phénol saturé d'eau.
2. Phénol saturé d'une solution aqueuse renfermant 3 % d'ammoniaque.
3. Phénol saturé d'une solution aqueuse renfermant 10 % d'ammoniaque.

Avec le papier 2043 b on a essayé le milieu :

1. Phénol saturé d'une solution aqueuse renfermant 3 % d'ammoniaque.

Avec ces différents milieux et les deux papiers étudiés, on peut voir 4 spots dont voici les caractéristiques :

1° Couleur bleu, Rf : 0,47 à 0,50.

2° Couleur bleu, Rf : 0,27 à 0,33.

3° Couleur bleu, Rf : 0,13 à 0,25.

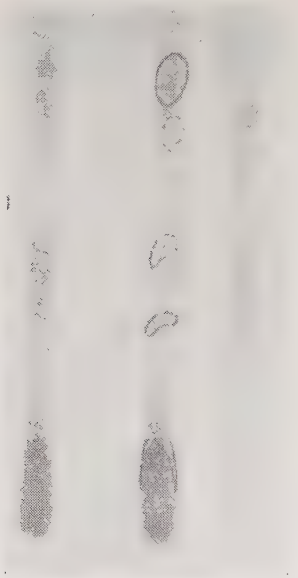
4° Couleur bleu, Rf : 0,03 à 0,09.

Ceci est résumé dans le tableau suivant :

SPOTS	ASPECT EN LUMIÈRE VISIBLE	ASPECT EN U. V.	VALEUR DES R.f. DANS LES DIFFERENTS SYSTÈMES			
			1	2	3	4
I	Bleu	Invisible	0,47	0,54	0,54	0,50
II	Bleu	Invisible	0,27	0,33	0,30	0,30
III	Bleu	Invisible	0,23	0,22	0,23	0.25
IV	Bleu	Invisible	0,09	0,03	0,03	0,03

Comme le montrent les résultats ci-dessus, le Bleu Monosol, livré par le commerce, n'est pas un produit pur mais bien un mélange de quatre constituants majeurs. Ces constituants doivent différer les uns des autres par leur degré de sulfonation, puisque le Bleu Monosol est obtenu à partir de la phtalocyanine de cuivre par traitement à l'acide sulfurique jusqu'à ce qu'on obtienne un degré suffisant de solubilité dans l'eau. Les produits possédant les Rf les plus faibles sont les plus hydrosolubles, donc ceux qui sont les plus sulfonés. L'espacement régulier des valeurs de Rf nous laisse supposer que les quatre produits correspondent respectivement aux dérivés mono, di, tri et tétrasulfonés ; ce dernier composé ayant un reste d'acide sulfurique sur chaque noyau benzénique de sa molécule. Le nombre des constituants réels est peut-être

encore plus important, en raison des nombreux isomères de position qui correspondent aux divers emplacements possibles des groupements — S03 sur les noyaux benzéniques.



De gauche à droite :

— Bleu Trypan.

— Bleu Trypan : les spots visibles en U. V.

— Bleu Monosol.

ÉTUDE POTENTIOMÉTRIQUE

Avant d'injecter à l'animal des solutions aqueuses de Bleu Monosol, il était important de connaître le *p*H de ces solutions et de savoir si ce colorant se comportait comme une substance tampon.

Technique :

L'étude potentiométrique a été réalisée en mesurant, au moyen d'un *p*H-mètre à électrode de verre, le *p*H de la solution colorante à laquelle on ajoutait des quantités croissantes de soude ou d'acide chlorhydrique titrés.

Les meilleurs résultats ont été obtenus avec le protocole suivant :

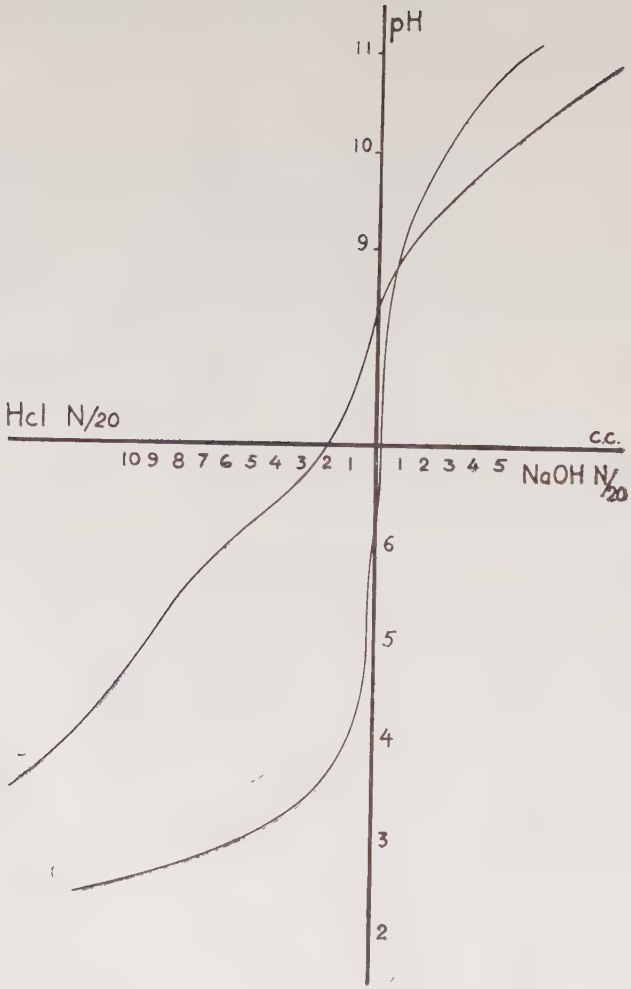
— Solution de colorant à 0,675 % ... 50 cm^3 ;
— Soude N/20 ;
— Acide chlorhydrique N/20.

Résultats :

On constate une grande différence de comportement entre le Bleu Trypan et le Bleu Monosol.

Pour le premier colorant, le *p*H de la solution aqueuse est voisin de 6,1 ; la moindre addition de soude ou d'acide chlorhydrique amène de grosses variations dans les valeurs du *p*H ; le Bleu Trypan est dépourvu de propriétés tampon, ceci malgré l'existence dans sa molécule de plusieurs fonctions sulfonées.

Au contraire, la courbe qui traduit les variations des valeurs du *p*H des solutions aqueuses de Bleu Monosol se montre constituée d'un certain nombre de paliers successifs. L'examen des courbes montre des points d'inflexion correspondant à différentes valeurs de pK ; les pK de 5,1 et de 9 sont très apparents ; le point d'inflexion correspondant à pK 6,5 est beaucoup plus discret.



La courbe la plus étalée est celle du Bleu Monosol.
L'autre celle du Bleu Trypan.

Il faut remarquer que de nombreuses mesures du *p*H des solutions aqueuses de Bleu Monosol nous ont donné un chiffre moyen de 8,30 ; opérant sur un échantillon différent du nôtre, Neuzil et Bailenger, en 1952, avaient noté le chiffre de 7,34. On remarquera sur la courbe que ces différences de *p*H ne sont pas très significatives car elles correspondent à une région du graphique dans laquelle la pente de la courbe est particulièrement importante.

TENSION SUPERFICIELLE

On sait que les solutions aqueuses des divers produits organiques présentent un pouvoir hémolytique lorsque les substances dissoutes abaissent notablement la tension superficielle de la solution.

Nous avons donc étudié comparativement les tensions superficielles des solutions aqueuses à 0,675 % de nos deux colorants.

Cet examen a été réalisé avec l'appareil de Dognon et Abribat ; les mesures ont été réalisées à la température du laboratoire. Nous avons pris soin avant chaque mesure de vérifier que l'appareil donnait pour l'eau distillée la valeur classique de 73 dynes/cm.

Avec les deux colorants, nous avons observé une légère baisse de la tension superficielle, surtout marquée pour le Bleu Trypan. On constate en outre que la tension superficielle diminue progressivement après la réalisation de la solution pour finir par se stabiliser après une heure.

Pour le Bleu Trypan, nous adoptons le chiffre de 53,5 dynes/cm.

Pour le Bleu Monosol, c'est le chiffre de 60,75 dynes/cm.

VISCOSITÉ

Techniques :

Nous avons recherché la viscosité du Bleu Monosol et du Bleu Trypan mis en solution à 0,75 % dans de l'eau distillée.

Nous avons utilisé le viscosimètre à bille de Höppler à la température de 24°5.

Nous nous sommes servis de la formule suivante :

$$Vi = K (db - ds) T$$

dans laquelle K = une constante de l'appareil et de la bille,

db = la densité de la bille,

ds = la densité de la solution,

T = le temps de chute donné par le viscosimètre exprimé en secondes,

Vi = la viscosité exprimée en centipoise.

Résultats :

Viscosité du Bleu Trypan : 0,825 centipoise.

Viscosité du Bleu Monosol : 0,939 centipoise.

Qu'il nous soit permis de remercier ici Mme et M Jensen, ainsi que tous nos camarades du laboratoire de chimie biologique de la Faculté de Médecine qui nous ont aidé pour la partie chimique de notre travail.

DIALYSE

Dans le but de comparer la taille particulaire du Bleu Monosol et du Bleu Trypan, nous avons effectué un certain nombre d'expériences de dialyse.

La technique utilisée a été la suivante : Nous avons enfermé une solution de colorant à 0,675 % dans un tube de cellulose (nous avons utilisé des tubes de cellulose fabriqués par la Visking Corporation de Chicago : Nojas casings, taille 24/32).

Chaque cylindre, qui renfermait 40 cm^3 de la solution de colorant, a été soigneusement fermé à ses deux extrémités puis plongé dans un récipient rempli d'eau distillée. Des précautions particulières ont été prises afin d'éviter toute fuite de colorant au niveau de la fermeture des tubes.

Nous avons examiné la traversée du colorant et son passage dans l'eau distillée extérieure au tube de cellulose ; l'eau distillée extérieure a été changée huit fois, à intervalles réguliers, sur une période de six semaines. Nous avons conservé un échantillon de chaque dialysat.

Résultats :

Les deux colorants étudiés présentent un comportement nettement différent.

Le Bleu Trypan se révèle extrêmement peu homogène, comme le prouve la coloration des différentes fractions recueillies hors du dialyseur :

I. Rouge pâle.
II. Rose pâle.
III. Mauve.
IV. Lilas.
V. Violet pâle.

VI. Violet foncé.
VII. Bleu pâle.
VIII. Bleu.

En fin d'expérience il restait à l'intérieur du dialyseur une solution fortement colorée en bleu noir.

De gauche à droite :

— Bleu monosol dialysé.
— Bleu monosol pur.
— Bleu trypan dialysé.
— Bleu trypan pur.

Cette expérience de dialyse mérite d'être rapprochée des résultats que nous avons observés en injectant à l'animal du Bleu Trypan par voie intraveineuse. En effet, tandis que le composé bleu noir se fixe au niveau des cellules, les constitutants de teinte rouge s'éliminent rapidement par les urines. Il semble donc que ces derniers constituants possèdent une taille particulaire beaucoup plus faible.

Nous avons réalisé l'étude chromatographique de la solution de Bleu Trypan ayant subi la dialyse pendant quarante jours contre de l'eau distillée. Nous avons constaté que l'élimination des colorants rouges n'est pas totale puisqu'on retrouve sur les chromatogrammes quelques traces des spots 1 et 5.

Les diverses fractions recueillies au cours de la dialyse du Bleu Monosol se montrent au contraire très voisines : elles sont toutes colorées en bleu pâle. Il semble donc que, pour le Bleu Monosol, la taille particulaire des différents constituants est la même. Ce résultat est évidemment en rapport avec la présence dans les quatre constituants précédemment différenciés par la chromatographie, du même noyau de la tétrazabenzoporphyrine.

D'ailleurs, la chromatographie de la solution de Bleu Monosol ayant subi une dialyse de quarante jours contre de l'eau distillée, ne montre guère de différence par rapport à la solution non dialysée.

TROISIEME PARTIE

ÉTUDE HISTOLOGIQUE

TOXICITE.

Neuzil et Bailenger, en 1952, avaient envisagé que les phtalocyanines introduits dans l'organisme pourraient entrer en compétition avec les pigments tétrapyrroliques naturels, du fait de l'analogie de leur constitution chimique. Et cela, d'autant plus, que Cook, en 1938, avait décrit des propriétés catalytiques chez un certain nombre de phtalocyanines, propriétés voisines de celles des enzymes.

Mais cette hypothèse ne fut pas retenue par les auteurs, qui firent une série d'expériences démontrant la non toxicité des phtalocyanines.

C'est ainsi que, parmi les protozoaires, des spécimens de *Glaucoma piriformis* peuvent vivre et se multiplier dans un milieu contenant 0,5 % de Bleu Monosol 2 G. On note simplement une diminution du rythme de reproduction. Le même résultat fut obtenu avec *Euglena Gracilis*, *Balantidium coli*, *Trichomonas muris*, *Opalina ranarum* et *Entamoeba invadens*.

Parmi les Métazoaires, des expériences furent entreprises et donnèrent des résultats identiques. Les auteurs ne relevèrent aucune toxicité vis-à-vis de Crustacés (*Daphnia*, *Cyclops*), de Nématodes (*Anguillula aceti*) et de Poissons (*Gambusia affinis*).

Enfin, l'injection intraveineuse quotidienne de 10 cm^3 de Bleu Monosol 2 G à 0,8 % dans l'eau physiologique, à un lapin, put se poursuivre pendant plus d'un mois sans perte de poids ni diminution du nombre d'hématies circulantes et du taux d'hémoglobine.

Expériences personnelles.

Première expérience :

Cette expérience a porté sur 20 rats adultes répartis en deux lots. Un lot a reçu du Bleu Monosol, l'autre du Bleu Trypan. Ces deux colorants, tous deux dosés à 0,75 % en eau physiologique, ont été injectés par voie intrapéritonéale à raison d'un centicube par 100 grammes de poids des animaux. L'expérience débute le 24 novembre 1953 et se termine le 20 décembre 1953.

Elle montrera que les animaux soumis aux injections de Bleu Trypan perdent du poids et meurent plus ou moins rapidement, tandis que ceux qui reçoivent du Bleu Monosol semblent peu incommodés, gardent un bon appétit, un bon aspect extérieur et, en définitive, gagnent du poids.

Le tableau suivant montre la quantité de Bleu Trypan qu'ont reçue les rats.

BLEU TRYPAN				BLEU MONOSOL			
N°	Poids av.	Poids ap.	Differ.	N°	Poids av	Poids ap.	Différ.
C1 OI	241	210	— 31	C1 OG	255	283	+ 28
C1 OD	174	138	— 36	C2 OF	166	205	+ 39
C1 OG	201	180	- 21	C2 OD	169	238	+ 69
C1 OC	189	140	- - 49	C1 OD	183	220	+ 37
C1 OF	174	176	+ 2	C1 OC	170	217	+ 47
C2 OI	218	178	40	C1 OF	215	221	6
C2 OD	204	173	- 31	C2 OI	195	227	+ 32
C2 OG	241	184	— 57	C1 OI	243	251	+ 8
C2 OC	193	146	— 47	C2 OG	190	206	+ 16
C2 OF	229	176	— 53	C2 OC	254	278	+ 24

Chaque fois qu'un animal soumis au Bleu Trypan meurt, on sacrifie le rat du lot Bleu Monosol qui, au début de l'expérience, avait le même poids ou tout au moins le poids le plus proche. Les animaux pesés au début de l'expérience et après montrent les pertes et gains suivants :

N° du rat	Poids	Date de mort	Nbre d'inj.	Quant. totale de B T
C2 OC	193	2-12-53	3	5,7
C1 OI	241	4-12-53	4	9,6
C2 OG	241	7-12-53	4	9,6
C1 OD	174	9-12-53	5	8,5
C1 OG	201	9-12-53	5	10
C1 OC	189	9-12-53	5	9
C1 OF	174	9-12-53	5	8,5
C2 OI	218	9-12-53	5	10,5
C2 OD	204	14-12-53	5	10
C2 OF	229	20-12-53	5	11

En moyenne, les animaux traités au Bleu Trypan ont perdu 36,3 g, tandis que ceux soumis au Bleu Monosol ont gagné 30,6 g.

Le tableau suivant indique les doses mortelles de Bleu Trypan, trouvées au cours de cette expérience.

N° des rats	POIDS	QUANTITÉ DE BLEU TRYPAN		
		En c/c par animal	En pourcentage	En m/mg
C 1 O I	240	9,6	4	30
C 1 O D	170	8,5	5	37,5
C 1 O G	200	10	5	37,5
C 1 O C	180	9	5	37,5
C 1 O F	170	8,5	5	37,5
C 2 O I	210	10.5	5	37,5
C 2 O D	200	10	5	37,5
C 2 O G	240	9,6	4	30
C 2 O C	190	5,7	3	22,5
C 2 O F	220	11	5	37.5

La moyenne donne comme dose mortelle une quantite de 34,5 milligrammes, pour un rat de 100 grammes.

Si nous admettons pour « dose léthale » la quantité de colorant exprimée en pourcentage nécessaire pour tuer la moitié des animaux en expérience, nous trouvons le chiffres de 36 milligrammes.

Par contre, cette même dose de 36 milligrammes pour 100 grammes de rat est bien supportée quand il s'agit du Bleu Monosol.

Deuxième expérience :

Cette expérience porte sur 12 rats répartis en deux lots. Le premier lot comprend 7 animaux qui sont soumis au

Bleu Monosol ; le deuxième en comprend 5 qui reçoivent du Bleu Trypan.

Les injections se font toujours par voie intrapéritonéale. Les solutions sont à 0,75 % en eau physiologique. Chaque injection correspond à 1 centimètre cube par 100 grammes de rat.

Dans le lot soumis au Bleu Trypan, 3 animaux meurent en dix jours, après avoir reçu six injections, soit des doses de colorant de 12,6, 11,4 et 9 centicubes. Les 2 rats survivants sont en mauvais état physique et sont sacrifiés.

Dans le lot soumis au Bleu Monosol, 5 animaux sont sacrifiés ce même jour. Les deux autres sont en très bon état. Ils vont mourir cependant, après avoir reçu, l'un 10,5 centicubes de Bleu Monosol en onze jours et l'autre 14,3 centicubes en vingt-deux jours.

Tous les animaux, sauf un, soumis au Bleu Trypan, ont perdu du poids entre le début et la fin de l'expérience. Tous ceux soumis au Bleu Monosol en ont pris, sauf un. Ceci est résumé dans le tableau suivant.

BLEU TRYPAN				BLEU MONOSOL			
N°	POIDS		DIFFERENCE	N°	POIDS		DIFFERENCE
	Avant	Après			Avant	Après	
B T M 1	215	164	- 51	B M S 1	200	220	+ 20
				B M S 2	200	245	+ 45
B T M 2	190	157	— 33	B M S 3	150	172	+ 22
B T M 3	150	120	— 30	B M S 4	165	195	+ 30
				B M S 5	150	160	+ 10
B T S 4	180	165	— 15	B M M 6	150	157	+ 7
B T S 5	150	165	+ 15	B M M 7	130	115	— 15

En moyenne, les animaux soumis au Bleu Trypan perdaient 22,8 grammes, tandis que ceux qui recevaient du Bleu Monosol gagnaient 18,1 grammes.

Les quantités de colorant indiquées dans le tableau ci-dessous :

	N° des rats	POIDS	QUANTITÉ DE COLORANT		
			En c/c par animal	En o/o	En m/mg
TRYPAN	B T M 1	215	12,6	5,86	43,9
	B T M 2	190	11,4	6	45
	B T M 3	150	9	6	45
	B T S 4	180	10,8	6	45
	B T S 5	150	9	6	45
MONOSOL	B M S 1	200	12	6	45
	B M S 2	200	12	6	45
	B M S 3	150	9	6	45
	B M S 4	165	9,6	5,75	43,1
	B M S 5	150	9	6	45
	B M M 6	150	10,5	7	52,5
	B M M 7	130	14,3	11	82,5

nous indiquent des doses mortelles de 45 milligrammes en moyenne pour 100 grammes en ce qui concerne le Bleu Trypan et de 70,5 milligrammes pour le Bleu Monosol.

COLORATION VITALE.

A. - Techniques.

Les expériences ayant pour but de montrer la localisation du colorant dans les différentes cellules ont été faites sur 30 rats et 10 lapins.

On a employé des solutions stériles de Bleu Trypan et de Bleu Monosol dosé à 0,75 % en eau physiologique.

Les modes d'introduction ont été la voie intracardiaque et la voie intrapéritonéale pour les rats, la voie intraveineuse (veine marginale de l'oreille) pour les lapins.

Les pièces prélevées ont été : le foie, la rate, les ganglions lymphatiques, le mésentère, les poumons, les surrénales, le rein, le testicule, l'épididyme, la vessie et la peau. Ces pièces ont été fixées au Bouin. Deux lames de chaque organe ont été colorées, l'une à l'hémalun éosine, l'autre à l'éosine seule, pour déceler plus rapidement le colorant.

B. - La coloration, fonction du mode d'introduction.

La même quantité de colorant introduite dans l'organisme par deux modes différents se fixe selon deux modalités.

Par voie intrapéritonéale, l'introduction de 3 centicubes de Bleu Monosol permet de constater la présence de cellules colorées en grosse quantité dans les ganglions abdominaux, le mésentère, les capsules d'enveloppe des organes abdominaux ainsi que dans le rein. On ne décèle que de très faibles quantités de colorant dans le foie et dans la rate.

L'emploi de la voie intracardiaque permet la coloration d'un très grand nombre de cellules à l'intérieur du foie, de la rate, des poumons (si toutefois la dose est suffisante), et des cellules dans tout le tissu conjonctif.

Par contre, l'introduction intrapéritonéale de la même quantité de Bleu Trypan chez un animal de même poids permet de constater une coloration d'emblée assez importante de tous les organes énumérés ci-dessus. Les poumons, cependant, ne sont pas atteints, alors qu'ils le sont par voie intracardiaque.

C. - La coloration, fonction des doses employées.

Trois centicubes de Bleu Monosol introduits dans l'abdomen d'un rat adulte de 300 grammes ne se retrouvent qu'en quantité très minime dans le foie et la rate. Ils sont à peu près entièrement fixés par le mésentère et les ganglions abdominaux. Par contre, une deuxième injection de la même quantité faite trois jours après donne une coloration beaucoup plus marquée dans tous les organes.

Pour le Bleu Trypan, au contraire, la différence est moins marquée. La quantité de colorant retenue dans l'abdomen ne varie pas. Celle retrouvée dans le foie et la rate est à peu près identique.

D. - La coloration, fonction du temps entre l'injection et l'examen.

Lorsque l'on augmente le temps écoulé entre l'injection de Bleu Monosol et l'examen des pièces, c'est-à-dire qu'on laisse écouler un temps de soixante-douze heures au lieu de vingt-quatre, on constate une disparition assez rapide du colorant dans la rate, les poumons et, d'une manière

générale, dans tous les organes contenant de rares histiocytes. Par contre, la quantité croît dans le foie.

	Rein		Ganglions		Rate		Poumons		Foie		Organes à histiocytes	
	Trypan	Monosol	T	M	T	M	T	M	T	M	T	M
2 inj. de 3 cc. délai : 7 j	+	+	+ +	+	+ +	—	+	—	+ +	|| ||	+	—
2 inj. de 3 cc. délai : 5 j.	+ +	+	+	+ + +	+	+	+	+	+ +	+	+	+
Inj. de 3 cc. délai : 4 j.	+	+	+	+	+	—	—	—	+	—	+	—

D. - **Résultats d'ensemble.**

1° *Modalités d'emploi du Bleu Monosol :*

Pour obtenir une coloration d'ensemble du système histiocytaire par la voie intrapéritonéale, il faut donner des doses de Bleu Monosol doubles de celles de Bleu Trypan, pour avoir le même résultat. On doit donner environ deux centicubes d'une solution à 0,75 % pour 100 grammes de poids (chez le rat) répartis en deux injections espacées de trois jours.

Par voie intracardiaque, les doses de Bleu Monosol peuvent être identiques à celles de Bleu Trypan.

Pour le lapin, on donne 0,5 centicube de cette même solution par 100 grammes de poids. On emploie alors la voie intra-veineuse.

Pour avoir de bons résultats, le temps écoulé entre la dernière injection et le sacrifice de l'animal ne doit pas dépasser vingt-quatre heures.

2° *Cellules où nous avons observé la fixation du Bleu Monosol :*

Nous avons trouvé la localisation classique des histiocytes. Il n'y avait aucune différence, qualitative tout au moins, entre les coupes d'animaux traités au Bleu Trypan et celles d'animaux traités au Bleu Monosol.

Nous avons ainsi pu mettre en évidence :

— Les cellules des divers réticulums ;

— Les cellules de Kuppfer ;

— Les histiocytes existant un peu partout dans le tissu conjonctif ;

— Certaines cellules endothéliales

Nous avons constaté, tant avec un colorant qu'avec l'autre, que les histiocytes apparaissent en plus grand nombre au fur et à mesure que croissait la quantité de colorant injecté.

Conclusions.

Le Bleu Monosol présente un certain nombre d'avantages lui permettant de figurer en bonne place dans les colorants vitaux.

— Ses propriétés chimiques (colloïde électro-négatif) lui permettent de colorer vitalement une cellule histiocytaire.

— Sa localisation dans l'organisme est identique à celle du Bleu Trypan qui nous a servi de comparaison.

— Il est doué d'une toxicité assez faible.

— La teinte de ses solutions (Bleu turquoise) facilite son repérage sur les coupes histologiques.

— Son prix de revient est assez faible.

CONCLUSIONS

I. — Une étude comparative de deux colorants du système histiocytaire est faite, d'une part le Bleu Trypan, colorant vital déjà connu, d'autre part le Bleu Monosol, colorant de synthèse du groupe des Phtalocyanines.

II. — Un certain nombre de constantes physico-chimiques sont données :

— Chromatographie,

— Etude potentiométrique,

— Tension superficielle,

— Viscosité,

— Dialyse.

III. — Une étude comparative de la toxicité des deux colorants est faite ; elle conclut à une moindre toxicité du Bleu Monosol par rapport au Bleu Trypan.

IV. — Des séries d'injections des deux colorants à divers animaux montrent que le Bleu Monosol se localise dans les éléments du système histiocytaire, de la même façon que le Bleu Trypan. Les modalités d'emploi sont données.

SERMENT

En présence des Maîtres de cette Ecole, de mes Condisciples, je promets et je jure d'être fidèle aux lois de l'Honneur et de la Probité dans l'exercice de la Médecine.

Je donnerai mes soins à l'indigent et n'exigerai jamais un salaire au-dessus de mon travail. Admis dans l'intérieur des maisons, mes yeux ne verront pas ce qui s'y passe; ma langue taira les secrets qui me seront confiés, et mon état ne servira pas à corrompre les mœurs ni à favoriser le crime.

Reconnaissant envers mes Maîtres, je tiendrai leurs enfants et ceux de mes Confrères pour des frères, et s'ils devaient apprendre la Médecine ou recourir à mes soins, je les instruirais et les soignerais sans salaire ni engagement.

Si je remplis ce serment sans l'enfreindre, qu'il me soit donné de jouir heureusement de la vie et de ma profession, honoré à jamais parmi les hommes, si je le viole et que je me parjure, puissé-je avoir un sort contraire.

Vu :
P. le Doyen :
L'Assesseur,
F. TAYEAU

Vu, le Président du Jury,
G. MAYER

Vu et permis d'imprimer.
Bordeaux, le 17 Décembre 1955

Le Recteur,
E. DELAGE

BIBLIOGRAPHIE

1. Akazaki K., Réticulo-endothélial system. *Acta Path. Japonica,* 1952, **2**, 113-142.

2. Anderson J.S., Bradbrock E.F., Cook A.H. & Linstead R.P., Phthalocyanine and associated compounds. Part XIII Absorption spectra. *J. Chem. Soc. London,* 1938, **2**, 1151-1156.

3. Aschoff L., Das retikulo-endothelial System. *Ergebn. d. inn. Med. Kinderheil,* 1924, **26**, 1.

4. Back Z.M. & Chèvremont M., Mise en évidence de choline dans un liquide provoquant la transformation histiocytaire dans les cultures de muscles squelettiques. C. R. Soc. Biol. Paris, 1944, **138**, 888.

5. Barret P.A., Dent C.E. & Linstead R.P.., Phthalocyanine. Part. VII. Phthalocyanine as a co-ordinating group. A general investigation of the metallic derivatives. *J. Chem. Soc. London,* 1936, **2**, 1719-1736.

6. Barret P.A., Frye D.A. & Linstead R.P., Phthalocyanine and associated compounds. Part XIV. Further investigations of metallic derivatives. *J. Chem. Soc. London* 1938, **2**, 1757-1763.

7. Barret P.A., Linstead R.P. & Tuey G.A.P., Phthalocyanine and related compounds. Part. XV. Tetrabenz-triaporphyn. Its preparation from phtalonitrile and a proof of its structure. *J. Chem. Soc. London* 1939, **2**, 1809-1820.

8. Barret P.A., Bradbrook G.F., Dent C.E. & Linstead R.P., Phthalocyanine and related compounds. Part XVI. The halogenation of phthalocyanine. *J. Chem. Soc. London* 1939, **2**, 1820-1828.

9. Barret P.A., Linstead R.P., Lewitt J.J. & Rowe G.A., Phthalocyanine and related compounds. Part XVIII. Intermediates for the preparation of tetrabenzporphins. The Thorpe reaction with phthalonitrile. *J. Chem. Soc. London* 1940, **2**, 1076-1079.

10. Barret P.A., Linstead R.P., Rundall F.G. & Tuey G.A.P., Phthalocyanine and related compounds. Part.. XIX. Tetrabenzporphins, tetrabenzmonazaporphins and their metallic derivations. *J. Chem. Soc. London* 1940, **2**, 1079-1092.

11. Beauchamp (de), Les colorations vitales. *Ann. Biol.*, 1906, **11**, 16-42.

12. Bessis M., Etude sur la cellule réticulaire normale et pathologique. *Rev. Hématol.*, 1947, **2**, 339.

13. Bianchi A. & Ramirez Corria C.M., Coloration des histiocytes du péritoine par la méthode de Del Rio Hortega. *C. R. Soc. Biol.*, 1926, **94**, 491.

14. Boivin A. & Delaunay A., Phagocytes, phagocytose et défense de l'organisme contre les infections. *Expérientia*, 1945, **1**, 262.

15. Boivin A. & Delaunay A., L'organisme en lutte contre les microbes. Ed. Gallimard, Paris, 1947.

16. Boivin A. & Delaunay A., Phagocytose et infections Ed. Hermann, 1947.

17. Bouffard, Injection des couleurs de benzidine aux animaux normaux. *Ann. Inst. Past.*, 1906, **20**, 539 .

18. Bratianu S. & Llombart A., Recherches sur l'histo-physiologie du S. R. E. Méthodes de recherches. *C.R. Soc. Biol.*, 1929, **101**, 135.

19. Buno W., Coloration vitale de la microglie. *C. R. Soc. Biol.*, 1933, **114**, 783.

20. Buno W., Cellules du système nerveux prenant la coloration vitale. *C. R. Soc. Biol.*, 1933, **114**, 785.

21. Buno W., Histiocytes des méninges et des plexus choroïdes. *C. R. Soc. Biol.*, 1934, **31**, 558-560.

22. Byrne G.T., Linstead R.P. & Lowe A.R., Phthalocyanine. Part II. The preparation of Phthalocyanine and some metallic derivatives from o-Cyanobenzamide and phtalimide. *J. Chem. Soc. London*, 1934, **2**, 1017-1022.

23. Chèvremont M., Le système histiocytaire ou réticulo-endothélial. *Bio. Reviews*, 1948, **23**, 267.

24. Cook A.H., Catalytic properties of the phthalocyanines. *J. Chem. Soc. London*, 1938, **2**, 1761-1780.

25. Cook A.H. & Linstead R.P., Phthalocyanine. Part XI. Preparation of octaphenylporphyrazines from diphenylmaleinitrile. *J. Chem. Soc. London,* 1937, **1**, 929.

26. Czarnecki E., Kiersz J. & Mietkiewski E., Die Leber im Farbstoffschock. *Internat. Arch. Allergy and Appl. Immunol.,* 1950, **1**, 285-291.

27. Czarnecki E., Kiersz J. & Mietkiewski E., Uber den Einfluss von Antistin auf Entstehung und Verlanl des durch Farlstoffe hervorgernfenen Schocks. *Internat. Arch. Allergy and Appl. Immunol.,* 1950, **1**, 292-298.

28. Czarnecki E., Kiersz J. & Mietkiewski E., Insuffisance rénale dans le choc consécutif à l'injection de colorant. *Internat. Arch. Allergy and Appl. Immunol.,* 1951, **2**, 19-22.

29. Dellepiane G., Sull'attivita granulopexica del S. R. E. nella vita foetale. *Boll. Soc. Biol.,* 1929, **4**, 636-638.

30. Dellepiane G., Sull'attivita funzionale del S. R. E. nella vita foetale. *Revista Patologia,* 1930, **5**, 200-222.

31. Dent C.E. & Linstead R.P., Phthalocyanine. Part. IV. Copper Phthalocyanine. *J. Chem. Soc. London,* 1934, **2**, 1027-1031.

32. Dent C.E., Linstead R.P. & Lowe A.R., Phthalocyanine. Part VI. The structure of the phthalocyanine. *J. Chem. Soc. London,* 1934, **2**, 1033-1039.

33. Dieryck J., Les épreuves fonctionnelles du S. R. E. *Rev. Belge des Sc. Méd.,* 1929, **1**.

34. Dieryck J., Du rôle du S. R. E. dans la production des anticorps. *C. R. Soc. Biol.,* 1931, **107**, 1598.

35. Doan C.A., The reticulo-endothelial system. Its physiology and pathology. *J. Lab. Clin. Med.,* 1940, **26**, 89.

36. Du Bois, Physiologie et physiopathologie du S. R. E. Masson, Ed., Paris, 1943.

37. Dupré A., Action de la lécithine et de corps voisins sur la transformation histiocytaire d'éléments musculaires et de fibrocytes en culture de tissus. *C. R. Soc. Biol.,* 1950, **144**, 1565-1568.

38. Elvidge J.A. & Linstead R.P., Conjugated macrocycles Part XXIV. A new type of cross-conjugated macrocycle, related to the azoporphins. *J. Chem. Soc. London,* 1952, 5008-5012.

39. Emery A.J. & Stotz E., Paper chromatography for analys of a dye mixture. *Stain Technol.*, 1952, **27**, 21-28.

40. Eriksen L., Paper chromatography of porphyrin pigments. *Scandinavian Journ. Clin. and Lab. Invest.*, 1953, **5**, 155-157.

41. Ficken G.E. & Linstead R.P., Conjugated macrocycles. Part XXIII. Tetra cyclo Hexano-Tetrazaporphin. *J. Chem. Soc. London*, 1952, 4846-4854.

42. Frédéric J., La transformation histiocytaire des cellules hépatiques cultivées *in vitro* et son déterminisme. *Revue d'Hémat.*, 1951, **6**, 423-447.

43. Gachkovski V.F., Fluorescence of magnesium phthalocyanine and chlorophyll in the absorbed state. *Doklady akad. Nank. S. S. S. R.*, 1950, **70**, 51-54.

44. Gachkovski V.F., Fluorescence of magnesium phthalocyanine and chlorophyll in various states. *Doklady akad. Nank, S. S. S. R.*, 1950, **71**, 509-511.

45. Camble J.F. & Hettig R.A., Effects of cortisone on the removal of India ink by the reticuloendothelial system. *Journ. Lab. and Clin. Med.*, 1952, **40**, 801-802.

46. Giannico O. & Marazza P., Vitamina De sistema reticuloendoteliale. *Fisiol. e Med.*, 1947, **15**, 469-474.

47. Giannico O. & Marazza P., Vitamin A and the reticuloendothelial system. *Fisiol. e Med.*, 1947, **15**, 577-583.

48. Gillman J., Gilbert C., Gillman T. & Spence I., A preliminary report on hydrocephalus, spina bifida and other congenital anomalies in the Rat produced by Trypan blue. *S. Afr. J. Med. Sci.*, 1948, **13**, 47.

49. Gillman J., Gillman T., Gilbert C. & Spence I., Lymphomata (including Hodgkin's like sarcomata). Their experimental production. *Clin. Proc.*, 1949, **8**, 222.

50. Gillman J., Gillman T. & Gilbert C., Reticulosis and reticulum-cell tumours of the liver produced in Rats by Trypan blue with reference to hepatic necrosis and fibrosis. *S. African Jour. Med. Sci.*, 1949, **14**, 21-83.

51. Gillman J., Gillman T. & Gilbert C., Production expérimentale de stimulation diffuse des tissus conjonctifs chez le Rat ; signification des constatations faites dans l'inter-

prétation des réticuloses de l'homme. *Sem. des Hôp.*, 1951, 1046-1077.

52. Granick S. & Bogorad L., Separation of porphyrins by countercurrent distribution. *Journ. Biol. Chem.* 1953, **202**, 781-792.

53. Grignard, Traité de Chimie organique, **22**, 408.

54. Guiliermond A., Toxicité des colorants vitaux. *C. R. Soc. Biol.*, 1930, **19**, 468.

55. Haddock N.H., Phthalocyanine colouring matters. Their chemistry and uses. *J. Soc. Dyers Col.*, 1945, **61**, 68-73.

56. Haddock N.H., Alcian blue, a new phthalocyanine dyestuff. *Research*, 1948, **1**, 685-689.

57. Halpern B.N., Biozzi G. & Mène G., Technique d'étude quantitative de l'activité granulopexique du S.R.E.. *C. R. Soc. Biol.*, 1950, **144**, 232-233.

58. Halpern B.N., Biozzi G. & Mène G., Cinétique de l'activité granulopexique du S. R. E. en fonction de la dose d'encre de Chine injectée. *C. R. Soc. Biol.*, 1950, **144**, 234-237.

59. Hazard R., Précis de thérapeutique et de pharmacologie. Masson, Ed., Paris, 1953.

60. Hodgkin, On some morbid appearances of the absorbant glands and spleen. *Tr. Roy. Med. Chir. Soc.*, 1832, **17**.

61. Kehl R. & Stick W., Uber die papierchromatographische Analyse der Porphyrine und einiger Gallenfarbstoffe. *Hoppe Seyler's Zeitschr. Physiol. Chem.*, 1952, **290**, 151-154.

62. Kench J.E., Lane R.E. & Varley H., Coproporphyrines urinaires dans l'intoxication saturnine. *Brit. J. Industr. Med.*, 1952, **9**, 133-137.

63. Kiyono K., Sugiyama S. & Amano S., Die Lehre von der Vitalfärbung. Kyoto, Japan, 1938.

64. Kuppfer C., Uber Sternzellen der Leber. *Arch. F. Mikr. Anat.*, 1876, **5**, 12.

65. Lhoest W., Colorants synthétiques en usage dans les industries alimentaires et pharmaceutiques. II. Séparation. *J. de Phar. de Belgique*, 1953, **8**, 260.

66. Linstead R.P., Phthalocyanine Part. I. A new type of synthetic colouring matters. *J. Chem. Soc. London,* 1934, **2**, 1016-1017.

67. Linstead R.P. & Lowe A.R., Phthalocyanine. Part III. Preliminary experiments on the preparation of Phthalocyanine from Phthalonitrile. *J. Chem. Soc. London,* 1934, **2**, 1022-1027.

68. Linstead R.P. & Lowe A.R., Phthålocyanine. Part V. The molecular weight of magnesium phthalocyanine. *J. Chem. Soc. London,* 1934, **2**, 1031-1033.

69. Linstead R.P. & Noble E.G., Phthalocyanine. Part. XII. Experiments on the preparation of tetrabenzporphyrins. *J. Chem. Soc. London,* 1937, **1**, 933.

70. Linstead R.P. & Robertson J.M., The stereochemistry of metallic phthalocyanine. *J. Chem. Soc. London,* 1936, **2**, 1736-1738.

71. Linstead R.P. & Rowe G.A., Phthalocyanine and related compounds. Part XVII. Intermediates for the preparation of tetrabenzporphyns. Acids derived from phthalimidine. *J. Chem. Soc. London,* 1940, **2**, 1070-1076.

72. Linstead R.P. & Weiss F.T., Phthalocyanine and related compounds. Part XX. Further investigations on tetrabenzporphin and allied substances. *J. Chem. Soc. London,* 1950, **2**, 2975-2981.

73. Linstead R.P. & Weiss F.T., Phthalocyanine.. Part XXI. The oxydation of phthalocyanine, tetrabenzporphin and allied substances. *J. Chem. Soc. London,* 1950, **4**, 2981-2987.

74. Linstead R.P. & Whalley M., Conjugated macrocycles. Part XXII. Tetrazaporphin and its metallic derivatives. *J. Chem. Soc. London,* 1952, 4839-4846.

75. Linstead R.P., Noble E.G. & Wright J.M., Phthalocyanine. Part IX. Derivatives of thiophen, thionaphten, pyridine and a note on the nomenclature. *J. Chem. Soc. London,* 1937, **1**, 911.

76. Lison L., Alcian blue 8 G with chlorantine fast red 5 B. A technic for selective staining of mucopolysaccharides. *Stain Tech.,* 1954, **29**, 131-138.

77. Maximow A., The macrophages and histiocytes in Special Cytology. Hoeber, Ed., New York, 1928.

78. Metchnikoff E., L'immunité dans les maladies infectieuses. Paris, 1901.

79. Midy R.M., Le conjonctif histiocytaire (S. R. E.). Masson, Ed., Paris, 1936.

80. Neuzil E. & Bailenger J., Etude biologique de dérivés hydrosolubles des phtalocyanines. *C. R. Soc. Biol.*, 1952, **146**, 1108.

81. Neuzil E. & Bailenger J., Etude des dérivés hydrosolubles des iminoporphyrines. Résumé des communications. II[e] Congrès international de Biochimie. Paris, 1952, **15**.

82. Nishikawa S., Studies on coproporphyrin isomers. I. Qualitative and quantitative determination by paper partition chromatography. *Journ. Japanese Biochem. Soc.*, 1952, **24**, 52-54.

83. Ogata, Uber die Systemeinteilung der hëmatopoïetischen Gewebe. *Jan. J. Med. Sc. V. Pathol.*, 1940, **5**, 1-12.

84. Overton, Studien über Aufnahme der Anilinfarben durch die Lebender. *Zelle Jahrb. Wiss. Bot.*, 1900, **34**, 670.

85. Ranvier L., Des clasmatocytes. *C. R. Acad. Sci. Paris*, 1890, **110**, 165.

86. Rao N.R., Shah K.H. & Venkataraman K., Chromatographic separation of dyes. *Current Science* (India), 1950, **19**, 149-150.

87. Renaut J., Les cellules connectives rhagiocrines. *Arch. Anat. micr.*, 1907, **9**, 495.

88. Ribbert H., Lehrbuch der allgemeinen Pathologie und der pathologischen Anatomie. Leipzig, Vogel, 1911.

89. Rimington C., Partition chromatography. *Biochem. Soc. Symposia*, 1950, **3**, 72.

90. Robertson J.M., An X-ray study of the structure of the phthalocyanine. Part I. *J. Chem. Soc. London*, 1935, **1**, 615.

91. Robertson J.M., An X-ray study of the phthalocyanine. Part II. Quantitative structure determination of the metal free compound. *J. Chem. Soc. London*, 1936, **2**, 1195-1209.

92. Robertson J.M. & Woodward I., An X-ray study of the phthalocyanine. Part III. Quantitative structure determination of nickel phthalocyanine. *J. Chem. Soc. London,* 1937, **1**, 219.

93. Robertson J.M. & Woodward I., An X-ray study of the phthalocyanine. Part IV. Direct quantitative analysis of the platinum compound. *J. Chem. Soc. London,* 1940, **1**, 36.

94. Rouslacroix A., Nouvelle revue d'ensemble sur le système réticulo-endothélial. Paris, Vigot, 1931.

95. Simpson C.L., Trypan blue induced tumours of rats. *Brit. J. Exper. Path.,* 1952, **33**, 524-528.

96. Smulders J., Recherches sur l'athrocytose discriminative dans le S. R. E. Etude qualitative et quantitative. *Arch. Biol.,* 1951, **62**, 133-193.

97. Steedman H.F., Alcian blue 8 GS : A new Stain for mucin. *Quart. J. Micros. Sci.,* 1950, **91**.

98. Stotz E., Conn H.J., Knapp P. & Emery A.J., Spectrophotometric characteristics and assay of biological stains. *Stain Technol.,* 1950, **25**, 57-68.

99. Teodoru C. & Feyel-Cabanes Th., Chloramphenicol et S. R.E. *Arch. Int. Pharmacodyn. et Thér.,* 1952, **90**, 498-510.

100. Thomas J.A., Recherches sur les tranformations, la multiplication et la spécificité des cellules hors de l'organisme. La cellule vitelline. Les cellules du type fibrocyte et du type histiocyte. *Ann. Sci. Nat. Zool.,* 1938, **1**, 209.

101. Timiras P.S. & Selye H., On the participation of the reticuloendothelial system in the alarm reaction. *Science,* 1949, **110**, 560-561.

102. Verne J., Ceccaldi P.F., Hébert S. & Barbarin Y., Différences selon le sexe de certaines réactions histologiques du Rat aux injections de Bleu Trypan. *C. R. Soc. Biol.,* 1954, **10**, 1543.

103. Vialli M., Osservazioni sull'uso dell'Alcian blue 8 GS nello studio dei mucopolisaccaridi. *Boll. Soc. Ital. Biol. Sper.,* 1951, **27**, 597-598.